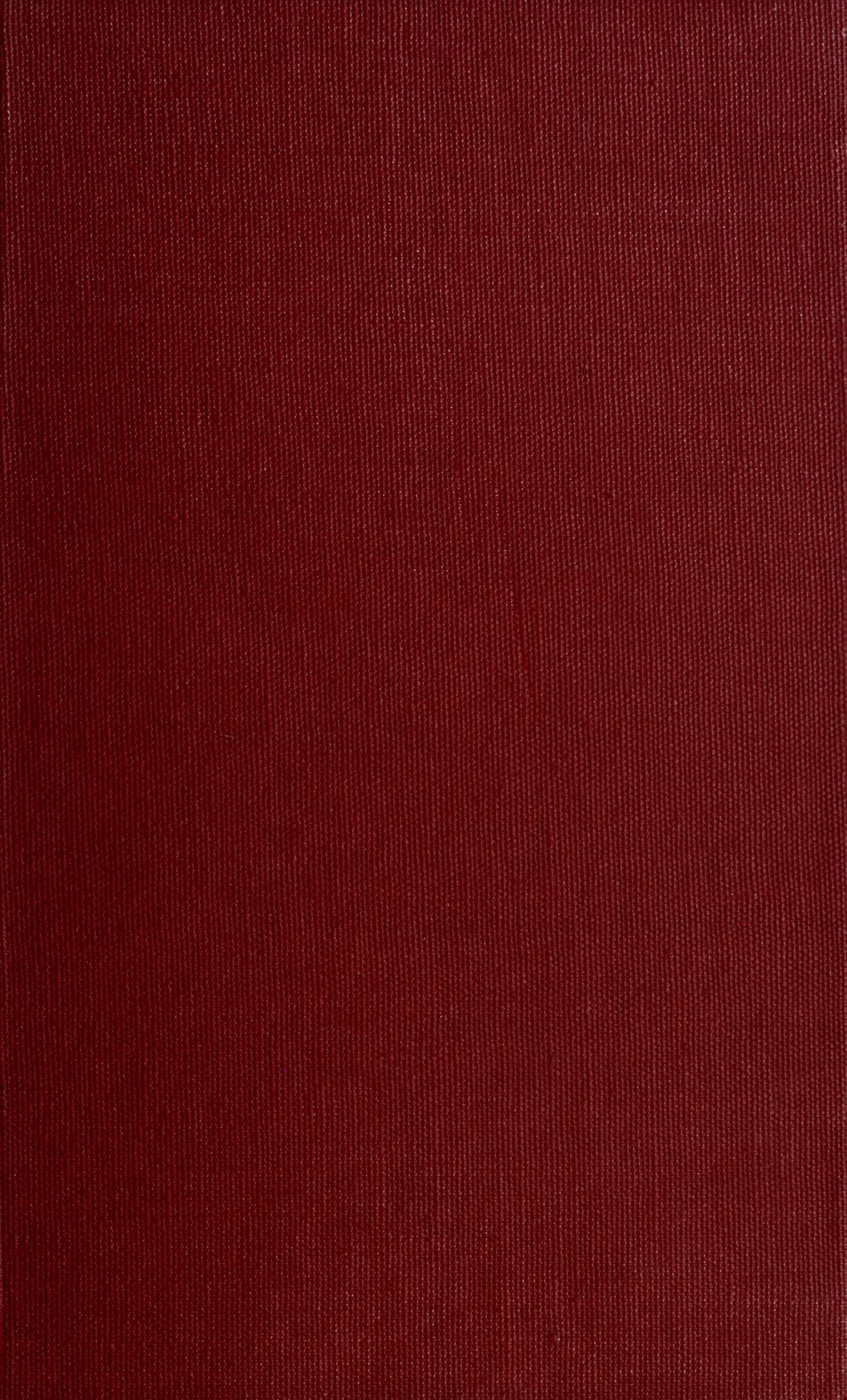


1900

ANNALES

DE L'INSTITUT PASTEUR

SCEAUX. — IMPRIMERIE E. CHARAIRE

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

(JOURNAL DE MICROBIOLOGIE)

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

ET PUBLIÉES

PAR

M. E. DUCLAUX

MEMBRE DE L'INSTITUT

PROFESSEUR A LA SORBONNE

DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

Assisté d'un Comité de rédaction composé de

TOME QUATORZIÈME

1900

AVEC SEPT PLANCHES

PARIS

MASSON ET Cie, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN

13me ANNÉE JANVIER 1900 No 1

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES
SUR L'INFLUENCE DE L'ORGANISME SUR LES TOXINES

PAR EL. METCHNIKOFF.

SUR LA SPERMOTOXINE ET L'ANTISPERMOTOXINE
QUATRIÈME MÉMOIRE

I

Ce mémoire est une contribution à l'étude du problème de l'origine des antitoxines. Depuis plusieurs années on s'efforce de trouver l'endroit où se produisent les antitoxines dans l'organisme. L'opinion la plus répandue considère que les organes, atteints par la toxine, sont eux-mêmes les foyers où se développent les antitoxines, qui de là passent dans le liquide sanguin. Cette théorie a été surtout développée par M. Ehrlich [1] et acceptée par beaucoup d'autres savants, parmi lesquels je citerai MM. Behring [2], Knorr [3], Wassermann [4] et Weigert [5]. Ceci ne présente rien d'étonnant, vu que l'hypothèse en question semble *a priori* très vraisemblable. Mais, lorsque nous avons essayé de la vérifier pour le tétanos [6], les faits recueillis ont plaidé plutôt contre la thèse, d'après laquelle l'antitétanine prendrait naissance dans les centres nerveux. Les expériences [7] de MM. Roux

1. *Klinisches Jahrbuch*, t. VI, 1897.
2. *Allgemeine Therapie der Infectionskrankheiten*, I, 1899.
3. *Münchener medicin. Wochenschrift*, nos 11 et 12, 1898.
4. *Berliner klinische Wochenschr.*, n° 1, 1898.
5. *Ergebnisse der allgemeinen Pathologie*, année IV, 1899, p. 107. M. Weigert, dans sa critique de nos travaux, me reproche de m'être servi de centres nerveux d'animaux immunisés contre la toxine tétanique à une époque beaucoup trop tardive Mon savant contradicteur a sans doute oublié que, dans un travail antérieur (ces *Annales*, 1897, p. 808), j'avais déjà mentionné que, même au début de la période antitoxique chez la poule, le pouvoir antitétanique ne se manifeste point dans les organes (les centres nerveux entre autres).
6. Ces *Annales*, 1898, p. 81.
7. *Ibid*, 1898, avril.



et Borrel sur le tétanos cérébral ont apporté un argument très important contre l'origine nerveuse de l'antitoxine tétanique. Elles ont démontré que les lapins activement immunisés contre le tétanos, et qui renferment dans leur sang une quantité notable d'antitoxine, inoculés dans le cerveau, prennent le tétanos cérébral aussi bien que les témoins non vaccinés. Ce fait a été confirmé par M. Behring.

Comme il est pratiquement impossible de résoudre le problème d'une façon définitive sur des animaux, traités par la toxine tétanique ou par n'importe quel autre poison microbien, il a fallu chercher une autre voie. Nous nous sommes adressé à ces poisons artificiels qu'on obtient chez des animaux auxquels on injecte du sang ou des tissus, provenant d'autres espèces.

MM. Belfanti et Carbone [1] ont remarqué les premiers que le sang des chevaux, traités avec du sang de lapin, acquiert après quelque temps une propriété toxique vis-à-vis des lapins. M. J. Bordet [2] a obtenu aussi un sang toxique pour le lapin, en injectant à ce rongeur du sérum sanguin de cobayes préalablement traités avec du sang de lapin. Il a établi ensuite que ce pouvoir toxique réside dans la propriété acquise, par le sérum de ces cobayes, de dissoudre les globules rouges de lapin et de leur enlever leur hémoglobine. Ces faits ont été confirmés et établis en règle générale non seulement pour les hématies, mais aussi pour d'autres éléments cellulaires, comme les spermatozoïdes (Landsteiner), l'épithélium vibratile (V. Dungern) et les leucocytes.

Parmi ces poisons artificiels, agissant sur diverses catégories de cellules, il y en a qui touchent aux éléments indispensables pour la vie (comme les hématies), tandis que d'autres n'empoisonnent que des cellules dont l'organisme peut se dispenser, sans pour cela cesser de fonctionner d'une façon satisfaisante. Tel est le cas des spermatozoïdes.

Tandis que d'un côté il est facile d'obtenir des toxines artificielles contre divers éléments cellulaires, on peut non moins facilement, de l'autre côté, préparer des antitoxines agissant contre ces poisons. M. J. Bordet [3] a démontré que les animaux dont les globules rouges sont dissous par le sérum du sang d'autres espèces produisent une antitoxine qui empêche cette

1. *Giorn. d. R. Accad. di med. di Torino*, 1898, n° 8.
2. Ces *Annales*, octobre 1898.
3. Ces *Annales*, 1899, avril.

action dissolvante. MM. Ehrlich et Morgenroth [1], dans leur mémoire si important sur les hémolysines, ont confirmé ce fait qui se rattache à la présence d'une antitoxine chez les animaux traités par le sérum d'anguille, et découverte par Camus et Gley, et Kossel.

A la suite des résultats que je viens de résumer brièvement, j'ai conçu l'expérience suivante, dans le but d'éclaircir le problème de l'origine de l'antitoxine. Je me suis proposé d'abord de préparer une toxine artificielle contre les spermatozoïdes d'une espèce animale, et ensuite, en traitant cette espèce avec du sérum toxique, de tâcher d'obtenir une antitoxine correspondante. Comme les organes sexuels mâles peuvent être facilement enlevés sans grand préjudice pour l'organisme, je me suis demandé si les animaux châtrés sont capables de produire l'antitoxine contre le poison des spermatozoïdes, au même titre que les mâles entiers. Les lignes qui suivront doivent présenter le récit de mes recherches à ce sujet.

II

SPERMOTOXINE

Pour mes expériences, je me servais de testicules et d'épididymes de lapins, que j'injectais dans le tissu sous-cutané de cobayes, après les avoir finement coupés avec des ciseaux, macérés dans de l'eau physiologique et passés à travers un tamis métallique. Les produits de deux ou quatre testicules suffisent pour que le sérum du sang des cobayes traités devienne toxique pour les spermatozoïdes du lapin. Le sérum de cobaye normal ne manifeste un pouvoir nuisible vis-à-vis de ces spermatozoïdes qu'à des doses beaucoup plus fortes que le sérum des cobayes traités.

On obtient donc facilement une spermotoxine artificielle qui immobilise les spermatozoïdes de lapin au bout de peu de minutes [2]. Lorsque cette immobilisation se fait très vite, les spermatozoïdes s'arrêtent sans s'être réunis en amas. Lorsque l'action nuisible de la spermotoxine est moins rapide, les spermatozoïdes se réunissent en petits amas étoilés, dont les rayons

1. *Berliner klinische Wochenschr.*, 1899, n° 22, p. 485.
2. Mes expériences dans des gouttes suspendues ont été exécutées au laboratoire à la température de 14°-16°.

sont représentés par les queues. Je n'ai jamais observé, même avec les sérums les plus spermotoxiques que j'aie en ma possession, de dissolution totale ou partielle des spermatozoïdes. Tout au plus si j'apercevais quelquefois la formation de petits granules sur le parcours de leurs queues.

La spermotoxine artificielle chez les cobayes traités est très spécifique. Le sérum de ces animaux agit un peu sur les hématies de lapin, en les dissolvant à un certain degré. Mais cette action doit être attribuée aux injections d'un peu de sang qui se trouve toujours mélangé à la suspension de testicules. Il doit se former dans ces conditions une certaine quantité d'hématolysine, substance différente de la spermotoxine. Je conclus à cette différence après avoir vu que des sérums de cobayes, traités avec du sang de lapin, et très hémolytiques, ne gènent en rien les mouvements des spermatozoïdes de lapin.

Les cellules de la glande testiculaire subissent une dissolution rapide dans les sérums spermotoxiques de cobayes, mais comme le même phénomène s'observe également sous l'influence du sérum de cobaye normal, on n'a pas le droit de conclure à une action particulière quelconque. D'un autre côté les cellules du foie, de la rate, du rein et des ganglions lymphatiques se conservent dans les sérums spermotoxiques aussi longtemps et aussi bien que dans le sérum de cobaye normal.

Il y a donc une action élective de la spermotoxine sur les spermatozoïdes, les autres éléments cellulaires ne présentant rien de particulier sous l'influence de ce poison artificiel. La spécificité de celui-ci peut être encore démontrée par une autre série de faits. Les spermatozoïdes d'autres espèces, de la souris, du rat, de l'homme et du cobaye même sont tout aussi peu gênés par le sérum spermotoxique du cobaye traité avec des organes mâles de lapin, que par le sérum de cobaye normal.

D'un autre côté les sérums, agissant contre les cellules de lapin, autres que les spermatozoïdes, sont dépourvus de toxicité pour ceux-ci. J'ai déjà cité le cas du sérum hémolytique. Des échantillons qui dissolvent les hématies de lapin en forte proportion et très rapidement, n'empêchent pas plus les mouvements de leurs spermatozoïdes que le sérum de cobayes neufs. Le même fait a pu être constaté pour le sérum antileucocytaire et le sérum des cobayes traités avec la muqueuse vibratile des

lapins. Les cils vibratiles de la trachée sont presque instantanément immobilisés par le sérum neuf de cobaye et même de lapin; ils subissent le même sort dans le sérum de cobayes ayant reçu à plusieurs reprises des injections sous-cutanées de la muqueuse trachéale. Ce sérum acquiert un pouvoir hémolytique, développé à la suite de l'injection d'une certaine quantité de sang, mélangé à l'épithélium vibratile, mais il reste tout aussi inactif vis-à-vis des spermatozoïdes de lapins, que l'est le sérum de cobaye neuf.

La spermotoxine, dont nous nous sommes servi dans nos expériences, est la substance active du sérum de cobayes, traités avec les organes mâles de lapins, et qui ne manifeste son influence nuisible que sur les spermatozoïdes de cette dernière espèce.

III

ANTISPERMOTOXINE

Comme le sérum spermotoxique de cobayes ne touche qu'aux spermatozoïdes du lapin, et en faible degré seulement aux hématies de ce rongeur, il n'est point étonnant que ses injections soient bien supportées par les lapins. Dans toutes mes expériences j'en introduisais à la fois de 2,5 c. c. à 7 c. c. dans le tissu sous-cutané. Répétées à trois ou quatre reprises dans l'espace de 5 à 19 jours, ces injections provoquaient un changement considérable dans les propriétés du sérum sanguin.

Le sérum du sang de lapins normaux, ajouté aux spermatozoïdes de lapins, produit une réunion de ces éléments en petits amas qui conservent cependant leur mobilité pendant un long espace de temps (de 24 à 48 heures). Mais si on ajoute de ce sérum en forte proportion (p. ex. 100 : 1), on constate alors, en dehors de la formation des amas, qu'au bout de quelques heures (3-4), les mouvements des spermatozoïdes se ralentissent, et qu'un certain nombre d'entre eux s'immobilisent complètement.

Sur un assez grand nombre de lapins normaux, étudiés sous ce rapport, je n'ai rencontré qu'une seule exception, où le sérum sanguin manifestait une forte action toxique sur les spermatozoïdes de lapin. Même en proportion de 3 : 1, ces élé-

ments s'immobilisaient presque instantanément, sans s'être réunis en amas.

Chez aucun de mes lapins normaux le sérum du sang n'a jamais présenté de pouvoir antitoxique vis-à-vis de la spermotoxine de cobaye. Le mélange de sérum de cobayes, traités avec des testicules de lapin, et de sérum de lapin normal. n'empêchait jamais l'immobilisation des spermatozoïdes surajoutés.

Au contraire, le sérum de lapins, qui avaient reçu à plusieurs reprises du sérum spermotoxique de cobaye, manifestait un pouvoir antitoxique des plus nets. Il suffisait, afin de le démontrer, de préparer une goutte suspendue, composée de 2 à 8 volumes de sérum de lapin traité, d'un volume de sérum spermotoxique, de 0,1 à 1 volume de sperme fraîchement recueilli sur un gros lapin. Les spermatozoïdes se réunissaient toujours en amas et conservaient une grande mobilité pendant des heures jusqu'à 24 heures et plus. Dans des gouttes témoins, où le sérum de lapins traités était remplacé par la même quantité de sérum de lapin neuf ou dans des gouttes préparées seulement avec du sérum spermotoxique et du sperme, les spermatozoïdes cessaient leurs mouvements déjà au bout de peu de minutes. Ce résultat était toujours constant et se présentait de la façon la plus précise : le sérum sanguin de lapins, injectés en trois ou quatre fois avec 14-15 c. c. de sérum spermotoxique de cobaye, acquiert une propriété antitoxique incontestable.

Lorsqu'au lieu de se servir de lapins mâles entiers, on opère avec des mâles châtrés, le résultat reste le même. La castration a été faite de deux façons : on enlève tous les organes mâles internes (sauf la prostate), ou bien on laisse la vésicule séminale dans le corps, et on élimine seulement les deux testicules avec les épididymes et les canaux déférents jusqu'au-dessus de la vésicule séminale. Comme cette dernière, dans tous les cas, au moins pendant la saison où j'exécutais mon travail (octobre-janvier), était remplie par un liquide transparent, ne contenant que des rares spermatozoïdes isolés, son abandon dans le corps du lapin ne constituait aucune objection contre l'exécution correcte de l'expérience. D'un autre côté, les lapins, auxquels on enlevait la vésicule séminale, se rétablissaient beaucoup plus lentement, et quelquefois même présentaient de la suppuration à l'endroit opéré.

Les épididymes renfermaient toujours une très grande quantité de spermatozoïdes mûrs, doués d'une grande mobilité.

Les lapins châtrés, c'est-à-dire privés des éléments sensibles à la spermotoxine, produisent néanmoins de l'antispermotoxine dans leur sang. Injectés en même temps que des témoins (lapins mâles non châtrés), avec les mêmes quantités de sérum spermotoxique de cobayes, ils ont manifesté un pouvoir antitoxique du sérum sanguin très développé. (V. Appendice I.) Dans une des expériences comparatives, où j'injectai le sérum spermotoxique exactement dans les mêmes conditions, à un mâle châtré et à un autre mâle entier, le sérum du dernier s'est montré un peu plus antispermotoxique que celui du lapin châtré. (V. Appendice II.) Mais, en revanche, dans une autre expérience pareille, le sérum du lapin châtré a manifesté un pouvoir antitoxique au moins deux fois plus fort que celui du témoin qui avait conservé ses organes mâles. (V. Appendice III.) Il y a ici évidemment une intervention de particularités individuelles qui empêchent de tirer des conclusions des différences de détail.

Après l'injection de quantités au fond assez faibles de sérum spermotoxique à des lapins, je n'ai jamais pu constater la présence d'antispermotoxine dans leur sang avant le douzième jour après la première injection. Quelques jours plus tard le pouvoir antitoxique atteignait son maximum, et, à peu près un mois après la dernière injection du sérum spermotoxique, l'antispermotoxine disparaissait complètement du sang de lapin. Toute cette évolution s'accomplit donc avec une grande rapidité. Quelquefois le sérum sanguin de lapin perd son pouvoir antitoxique très brusquement, de sorte que dans l'espace de deux jours on peut constater déjà une baisse formidable de l'antispermotoxine. En présence de ce fait, il est nécessaire de faire à des lapins en expérience des petites saignées assez fréquentes, sans quoi on risque d'arriver à des conclusions erronées.

Comme j'ai pu, chez un seul et même lapin châtré, établir d'abord : 1° l'absence du pouvoir antitoxique du sang avant la première injection de sérum spermotoxique et pendant les premiers jours du traitement ; 2° suivre ensuite l'apparition et l'accroissement de l'antispermotoxine d'une façon très précise, et 3° finalement déterminer la disparition de cette propriété antitoxique, le doute sur le développement de l'antispermotoxine dans le

sang des lapins châtrés et traités avec le sérum spermotoxique, devient impossible.

Il faut donc bien accepter ce fait que l'antitoxine n'est point le produit de la réaction des cellules, sensibles à la toxine correspondante. Dans le cas particulier qui nous occupe, l'antispermotoxine ne provient pas des éléments mâles, mais doit être élaborée par d'autres cellules, dont la nature ne peut être pour le moment que supposée, mais non déterminée d'une façon précise.

Il est impossible d'admettre que les spermatozoïdes manquant chez le lapin châtré fussent remplacés par un autre élément sensible, par la simple raison que les autres catégories de cellules ne sont pas intoxiquées par la spermotoxine.

Comme ce ne sont point les spermatozoïdes qui sécrètent l'antispermotoxine chez le lapin, il est tout naturel que ces éléments chez des animaux, dont le sang est antitoxique, manifestent une sensibilité marquée vis-à-vis de la spermotoxine. C'est en effet ce que nous avons pu observer. Nous avons enlevé un testicule avec son épididyme, à un mâle entier, quinze jours après une première injection de sérum spermotoxique. Les spermatozoïdes très nombreux que nous avons pu recueillir ont été rapidement immobilisés après l'addition de deux volumes de sérum spermotoxique. La sensibilité dans ce cas s'est montrée un peu plus faible que celle des spermatozoïdes, prélevés à un lapin neuf; mais cette différence peut être expliquée par la présence d'une petite quantité de sang, mélangé à du sperme. Le sérum sanguin du même lapin châtré, qui a fourni les spermatozoïdes sensibles, a exercé une action antitoxique des plus manifestes vis-à-vis des spermatozoïdes provenant du même animal, ainsi que de plusieurs lapins neufs. Cette expérience présente une certaine analogie avec celle de MM. Roux et Borrel, où ils produisent le tétanos cérébral chez un lapin activement immunisé contre la toxine tétanique et dont le sang était déjà antitoxique. Dans les deux cas l'élément sensible est touché par la toxine, malgré la présence de l'antitoxine dans le sang. Ces faits concordent bien avec le résultat général que l'antitoxine n'est pas le produit de la cellule sensible.

IV

CONCLUSIONS

1. Le sérum sanguin de cobayes, auxquels on injecte la macération des organes mâles de lapins, acquiert bientôt le pouvoir spermotoxique.

2. Le sérum sanguin de lapins, auxquels on injecte du sérum spermotoxique de cobayes, acquiert au bout de quelque temps le pouvoir antispermotoxique.

3. L'antispermotoxine qui se trouve dans le sérum sanguin des lapins ne peut être attribuée aux éléments mâles, car elle apparaît également dans le sang des lapins, préalablement châtrés.

APPENDICES

I

Action antitoxique du sérum sanguin d'un lapin mâle châtré, auquel on avait injecté en trois fois 15 c. c. de sérum spermotoxique de cobaye.

1. 5 volumes de sérum de lapin châtré[1]. 1 vol. de sérum spermotoxique de cobaye[2]. 0,1 vol. de sperme de lapin neuf.	Les spermatozoïdes se sont agglomérés en petits amas très mobiles. Trois heures après la préparation de la goutte suspendue, les mouvements des spermatozoïdes sont encore très vifs.
2. 4 vol. de sérum du même lapin châtré. 1 vol. du même sérum spermotoxique. 0,1 vol. de sperme de lapin neuf.	Les spermatozoïdes réunis en amas et très mobiles. Après 3 h. 30 m., la plupart sont encore assez mobiles ; un petit nombre ont perdu leur mobilité.
3. 3 vol. de sérum du même lapin. 1 vol. du même sérum spermotoxique.	Les spermatozoïdes se sont réunis en amas. Déjà au bout de cinq minutes la plupart ont cessé leurs mouvements. Quelque temps après il ne reste plus que quelques spermatozoïdes mobiles isolés.

1. Le sang a été retiré 14 jours après la dernière injection spermotoxique.
2. Ce sérum immobilise en quelques minutes les spermatozoïdes de lapin dans le rapport de 3 : 1.

0,1 vol. de sperme de lapin neuf.	
4. 6 vol. de sérum sanguin d'un lapin mâle neuf (témoin). 1 vol. de sérum spermotoxique du même cobaye que dans les mélanges précédents. 0,1 vol. de sperme de lapin.	Les spermatozoïdes, réunis en amas, ont presque tous perdu leur mobilité au bout de 5 minutes. Bientôt après le mouvement a cessé d'une façon complète.
5. 5 vol. de sérum du même lapin témoin. 1 vol. de sérum spermotoxique. 0,1 de sperme de lapin.	Au bout de 10 minutes, presque tous les spermatozoïdes, réunis en amas, se sont immobilisés.
6. 10 vol. de sérum sanguin du lapin témoin. 0,1 vol. de sperme de lapin.	Les spermatozoïdes, réunis en amas, sont encore très mobiles après 3 h. 50 m.
7. 6 vol. de sérum du lapin châtré. 1 vol. de sérum spermotoxique du cobaye n° 8 [1]. 1 vol. de sperme de lapin.	Quatre heures après la préparation du mélange, les spermatozoïdes, réunis en amas, sont très mobiles.
8. 6 vol. de sérum de lapin neuf (mâle). 1 vol. de sérum spermotoxique de cobaye n° 8. 1 vol. de sperme de lapin.	Dix minutes après la préparation du mélange, presque tous les spermatozoïdes (réunis en amas) ont perdu leurs mouvements.

II

Action antitoxique comparée d'un lapin châtré et d'un mâle entier.

Les deux lapins ont reçu dans l'espace de cinq jours chacun 15 c. c. de sérum spermotoxique de cobaye à trois reprises (7, 3, et 5 c. c.).

Le sang a été pris sept jours après la dernière injection.

1. 8 vol. de sérum du lapin châtré. 1 vol. de sérum spermotoxique [1]. 1 vol. de sperme de lapin.	Les spermatozoïdes, réunis en amas, ont été trouvés très mobiles après 4 heures 30 m. Même le lendemain, après 26 heures, on aperçoit encore des mouvements de certains d'entre eux.

1. Ce sérum était plus spermotoxique que le premier, car il immobilisait en 6 minutes presque tous les spermatozoïdes en mélange de 1 : 1.

2. 5 vol. de sérum de lapin châtré. 1 vol. de sérum spermotoxique. 1 vol. de sperme.	Quatre heures et demie après la préparation du mélange, les mouvements des spermatozoïdes, réunis en amas, durent encore, quoique moins vifs qu'au début.
3. 3 vol. de sérum du lapin châtré. 1 vol. de sérum spermotoxique. 1 vol. de sperme.	Les spermatozoïdes se sont réunis en amas. Leur mobilité, très vive au début, se ralentit progressivement. Au bout de quatre heures il ne reste plus que quelques amas mobiles.
4. 8 vol. de sérum du lapin (mâle) entier. 1 vol. de sérum spermotoxique. 1. vol. de sperme.	Quatre heures et demie après la préparation du mélange, les mouvements des spermatozoïdes (réunis en amas) sont encore assez forts. Le lendemain, 26 heures après, on aperçoit encore quelques mouvements.
5. 5 vol. de sérum du mâle entier. 1 vol. de sérum spermotoxique. 1 vol. de sperme.	Les spermatozoïdes se sont réunis en amas. Après 4 h. 1/2, les mouvements continuent quoique affaiblis. La mobilité est un peu plus accusée que dans le mélange correspondant du lapin châtré.
6. 3 vol. de sérum du mâle entier. 1 vol. de sérum spermotoxique. 1 vol. de sperme.	Au bout de 4 heures, les spermatozoïdes, réunis en amas, manifestent des mouvements affaiblis, mais plus prononcés que dans le mélange correspondant du lapin châtré.
7. 8 vol. de sérum de lapin neuf (témoin). 1 vol. de sérum spermotoxique. 1 vol. de sperme.	Au bout de 6 minutes, presque tous les spermatozoïdes ont perdu leur mobilité.

III

Comparaison du pouvoir antispermotoxique d'un lapin châtré et d'un mâle entier. Le premier avait reçu dans l'espace de neuf jours 14,25 c. c. de sérum spermotoxique en quatre fois.

Le second, en rapport avec son poids, avait reçu 15,75 c. c. de sérum spermotoxique les mêmes jours que le précédent.

1. 5 vol. de sérum du lapin châtré, retiré du sang, prélevé avant la 1re injection de sérum spermotoxique. 0,3 vol. de sérum streptococcique de cobaye. 0,1 vol. de sperme de lapin.	Au bout de 10 minutes, presque tous les spermatozoïdes, réunis en petits amas, sont devenus immobiles.
2. 5 vol. de sérum du lapin châtré, retiré du sang, extrait 5 jours après la dernière injection de sérum spermotoxique.	Les spermatozoïdes, réunis en petits amas, ont conservé leur mobilité pendant plusieurs heures. Cinq heures après la préparation du mélange, la grande majorité des spermatozoïdes sont encore mobiles. Deux heures plus tard, on observe encore un assez grand nombre de spermatozoïdes mobiles.

0,3 vol. de sérum spermotoxique de cobaye. 0,1 vol. de sperme de lapin.	
3. 5 vol. de sérum d'un autre lapin châtré, qui n'avait pas reçu d'injections de sérum spermotoxique. 0,3 vol. de sérum spermotoxique de cobaye. 0,1 vol. de sperme de lapin.	Au bout de 10 minutes, presque tous les spermatozoïdes, réunis en amas, ont perdu leur mobilité.
4. 5 vol. de sérum du lapin entier qui avait reçu 4 injections de sérum spermotoxique. 0,3 vol. de sérum spermotoxique de cobaye. 0,1 vol. de sperme de lapin.	Après 4 heures, on trouve quelques spermatozoïdes immobiles à la périphérie de la goutte; mais dans la partie centrale les spermatozoïdes restent mobiles.
5. 2 vol. de sérum du lapin châtré (le sang avait été retiré 10 jours après la quatrième injection du sérum spermotoxique). 0,2 vol. de sérum spermotoxique du cobaye n° 5. 0,1 vol. de sperme de lapin.	Trois heures et demie après la préparation du mélange, les spermatozoïdes sont très mobiles. Même le lendemain, 26 heures après la préparation du mélange, on trouve encore beaucoup de spermatozoïdes mobiles.
6. Même mélange 5 : 0,1 : 0,1.	
7. 2 vol. de sérum du lapin entier (le sang avait été retiré 10 jours après la quatrième injection du sérum spermotoxique). 0,2 vol. de sérum spermotoxique du cobaye n° 5. 0,1 vol. de sperme de lapin.	Une heure après la préparation du mélange, presque tous les spermatozoïdes ont perdu leur mobilité. Il n'est resté que quelques spermatozoïdes mobiles isolés. A l'inspection du lendemain il n'y a pas un seul spermatozoïde ayant conservé sa mobilité.

LE CHARBON DU CHIEN

Par H. MARTEL

D'une manière générale, le chien est réfractaire au charbon. Il convient de faire une exception en faveur des jeunes chiens (Colin, Straus, Peuch) dont la résistance est d'autant plus faible qu'ils sont de plus petite taille (Bardach). Il est d'ailleurs facile de les faire succomber à une infection charbonneuse à marche rapide, en leur inoculant la bactéridie dans la plèvre (Nocard)[1].

La résistance que les chiens adultes opposent à la bactéridie n'est pas absolue. La bibliographie contient un certain nombre d'observations de charbon accidentel consécutif à l'usage de viandes virulentes crues (Gilbert, Cornevin, Engel, Tannenhauser, Peuch, Davis...). On arrive d'ailleurs à provoquer un charbon mortel, chez les chiens adultes, en multipliant les tentatives d'infection expérimentale et en inoculant de grandes quantités de virus (Renault, Colin, Davaine, Brauell, Bollinger, Frænkel, Œmler, Hess, Straus, Malm...). En outre, en réalisant des conditions expérimentales un peu particulières, telles que l'extirpation de la rate, l'injection intraveineuse d'émulsion de charbon de bois (Bardach)[2], la privation d'eau (Pernicce et Alessi)[3], on augmente la réceptivité des sujets peu sensibles.

Pour ce qui est des modifications de la virulence de la bactéridie qui a passé par l'organisme du chien, des expériences du laboratoire de M. E. Roux ont montré que le virus charbonneux se trouve renforcé, pour le cobaye et le lapin, dans une mesure parfois assez grande (Malm)[4]. L'opinion opposée, émise par Sadowsky[5], est erronée. Elle n'a d'autre base scientifique que des expériences très peu nombreuses et mal interprétées.

1. *Cours sur les maladies contagieuses*, 1891-92, p. 44.
2. Rôle de la rate dans les maladies infectieuses, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1889, p. 577.
3. Cité par Nocard et Leclainche, *Maladies microbiennes des animaux*, 2e édition, 1898.
4. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1890, p. 520.
5. *Compte rendu des travaux spéciaux de l'Institut vétérinaire de Karkhoff*, 1889.

I

CHARBON DE PASSAGE CHEZ LE CHIEN

Création d'un virus charbonneux de passage. — Le charbon se renforçant par son passage à travers l'organisme du chien, il était tout indiqué de chercher à l'amener à un degré d'activité tel qu'il tuerait les chiens à tout coup. Malm a essayé d'atteindre ce résultat : il n'a pu réussir à préparer une bactéridie suffisamment exaltée pour faire les passages successifs de chien à chien. Les résultats très satisfaisants obtenus par Levin [1], avec le charbon des oiseaux, permettaient de prévoir qu'en multipliant les recherches on obtiendrait également de bons résultats avec le le charbon des chiens. Dans cet ordre d'idées, dès 1897, nous avons commencé des recherches sur le charbon expérimental des chiens. Dans le but d'affaiblir la résistance naturelle des sujets adultes, nous avons essayé avec succès les injections sous-cutanées de phloridzine en solution alcaline, à la dose de $0^{gr},20$ à $0^{gr},50$, ou de pyrogallol à raison de $0^{gr},20$ par kilogramme d'animal. Ces injections, faites 24 heures avant l'inoculation charbonneuse, facilitent l'infection, mais les passages successifs de chien à chien restent toujours difficiles à réaliser. Nous avons obtenu de meilleurs résultats, en nous adressant à l'organisme du chien atteint de rage expérimentale ou de rage des rues. Un seul passage par le chien enragé donne à la bactéridie une virulence suffisamment renforcée pour tuer les chiens adultes dans une assez forte proportion (71 0/0) et permettre les passages en série. Le chien enragé, inoculé avec 1 c. c. de bouillon charbonneux inoffensif pour le chien en bonne santé, meurt en moins de 24 heures avec pullulation de la bactéridie dans tous les organes. Dans une autre série d'expériences, faites avec une bactéridie provenant d'une vache charbonneuse, nous avons pu réaliser une série de 36 passages successifs par l'organisme du chien, avec une mortalité considérable (82 0/0). Le premier chien charbonneux de cette série, un animal adulte, avait succombé en 28 heures, à la suite de l'inoculation sous-cutanée de 1 c. c. d'une émulsion de rate de vache charbonneuse.

Exaltation progressive de la virulence. — Dans la plupart de nos inoculations, nous nous sommes servi de préférence des cultures en bouillon de peptone Chapoteaut, âgées de 4 à 5 jours et

1. *Om mjältbrand hos höns*, Stockholm, 1897.

restées à l'étuve à 33° pendant 2 ou 3 jours; nous avions remarqué que le sang et les pulpes d'organes des chiens charbonneux, malgré leur richesse en bactéridies, étaient souvent moins virulents que les cultures en bouillon ensemencé avec ces mêmes produits virulents. Ainsi que nous l'a fait remarquer M. E. Roux, il faut sans doute attribuer cette différence dans la virulence à l'existence d'une notable proportion de substances vaccinantes dans le sang des animaux charbonneux.

Par les passages successifs de chien à chien, la mortalité augmente d'abord proportionnellement au nombre des passages et finit par atteindre le summum. La mortalité permet donc d'évaluer le renforcement de la virulence. Les chiffres suivants indiquent une exaltation progressive de la virulence du charbon de passage des chiens. Sur 135 chiens d'expériences, la mortalité a été de 77,9 0/0 du 1er au 10e passage, 85,5 0/0 du 11e au 20e passage, 86,6 0/0 du 21e au 30e passage, 100 0/0 du 31e au 36e passage. En réalité, l'exaltation n'a pas une marche progressive aussi régulière. C'est ce qui ressort des chiffres que voici : du 1er au 5e passage, mortalité 60,8 0/0; du 6e au 10e, 95 0/0; du 11e au 15e, 77,7 0/0; du 16e au 20e, 83,3 0/0; du 21e au 25e, 81,1 0/0; du 26e au 30e, 93,9 0/0; du 30e au 36e, 100 0/0.

D'autres facteurs permettent également d'apprécier l'exaltation progressive de la virulence.

La durée de la période d'incubation, qui est de 24 à 36 heures dans la plupart des expériences faites avec le charbon des premiers passages par le chien, tombe à 10 heures, voire même 6 heures dans les 10 derniers passages (26e au 36e).

La durée de la survie est d'autant plus faible que le nombre des passages opérés est plus considérable. Tandis que la mort n'arrive qu'au bout de 4 à 6 jours dans les 30 premières expériences faites avec le charbon des premiers passages, elle survient en 24 à 30 heures dans les 50 dernières expériences de la série, c'est-à-dire dans les 14 derniers passages de chien à chien.

L'amaigrissement des sujets d'expériences est d'autant plus marqué que le nombre des passages par le chien est plus grand. La perte diurne moyenne donnée par la formule $a = \frac{p-p'}{np}$, dans laquelle p représente en grammes le poids initial du chien, p' le poids au moment de la mort, n le nombre de jours de la survie

et *a* l'amaigrissement, permet de suivre, jusqu'à un certain point, la marche progressive de la virulence. Tandis qu'au commencement de la série des passages, le chiffre d'amaigrissement est de 0,020 à 0,025, il atteint 0,028 à 0,030 vers le 12e passage, 0,032 à 0,035 vers le 17e passage, et oscille entre 0,040 et 0,044 dans les derniers passages.

Sensibilité de quelques races canines. — Toutes les races de chiens ne sont pas également sensibles au virus charbonneux de passage. Dans une série de 23 expériences, les chiens de rue meurent dans la proportion de 44 0/0, tandis que les chiens caniches succombent dans la proportion de 64,6 0/0. Dans une seconde série de 108 expériences, la mortalité atteint 66 0/0 chez les chiens loulous, contre 86 0 0 chez les chiens caniches. En général les chiens d'appartement et de luxe sont plus sensibles que les autres.

Influences diverses susceptibles de modifier la réceptivité. — Le mode de pénétration du virus charbonneux de passage influe sur les résultats de l'injection. Les chiffres suivants font ressortir cette influence. La mortalité est de 68 0/0 à la suite de l'inoculation sous-cutanée, elle atteint 85,6 0/0 lorsque l'injection est faite dans la plèvre, 87,5 0/0 lorsqu'on la pratique dans le système veineux et enfin 96 0/0 à la suite de l'inoculation intramusculaire.

L'âge constitue une autre cause de modification de la réceptivité. Les chiens adultes sont les plus résistants, ils fournissent une mortalité de 80,9 0/0; les chiens jeunes (un an et au-dessous) sont plus sensibles, ils meurent dans la proportion de 85 0/0; les chiens très vieux sont également très sensibles, ils donnent une mortalité de 87,5 0/0, enfin les très jeunes chiens (un jour ou deux d'âge) meurent tous.

Malm, dans une série de 24 expériences, avait remarqué que les chiens noirs sont plus sensibles que les autres au charbon non exalté par le passage à travers l'organisme des animaux réfractaires. Les chiffres que nous relevons dans nos expériences, faites avec le charbon de passage des chiens, montrent que, chez les chiens caniches, la mortalité est de 82,8 0/0 pour les individus noirs, 100 0/0 pour les sujets fauves et les sujets blancs; que chez les chiens de rue elle atteint 82,9 0/0 pour les individus dont le pelage est noir, 91,6 pour les individus blancs, et 93,9 0/0

pour les sujets dont la robe est multicolore, et que chez les chiens loulous fauves et les chiens loulous blancs elle atteint 100 0/0. De ces faits il semble résulter que l'influence de la race [1] prime l'influence de la couleur du pelage. Ajoutons qu'après une série de passages de la bactéridie par les chiens d'une race déterminée, de la race caniche par exemple, on éprouve toujours quelques difficultés pour transplanter le virus sur les chiens d'une autre race.

Inoculation du virus de passage des chiens aux animaux de laboratoire. — Malm a constaté que le passage de la bactéridie par l'organisme du chien non réfractaire renforce moins la virulence pour le cobaye et le lapin que le passage par les chiens tout à fait résistants.

De notre côté, nous avons noté que la moyenne de la survie des cobayes inoculés avec du virus de passage aux différents degrés de son exaltation est inférieure à la survie des cobayes tués par le même virus non renforcé. L'exaltation de la virulence pour le cobaye est très marquée après les premiers passages par le chien; la mort des cobayes survient en 24 à 30 heures. Elle est moindre après une vingtaine de passages par le chien; les cobayes succombent alors entre 36 et 40 heures.

Le pigeon est sensible au charbon de passage des chiens. Des traces de pulpe splénique riche en bactéridies, de 26e passage par le chien, tuent le pigeon en 3 jours, par inoculation dans les muscles pectoraux. Il existe de la nécrose au point d'inoculation et des bactéridies dans le sang.

A la dose de 2 gouttes inoculées sous la peau, les cultures en bouillon contenant de nombreux bacilles de 27e passage par le chien tuent les jeunes rats d'égout en 20 à 26 heures. Le rat adulte, qui résiste à une première inoculation sous-cutanée de charbon de 27e passage, tuant le chien en 30 à 36 heures, succombe en moins de 20 heures au charbon qui a passé par l'organisme du rat jeune. Après la mort, on retrouve toujours la bactéridie dans le sang et dans les organes.

Le chat, très sensible au charbon de passage des chiens, meurt en 24 à 48 heures à la suite de l'inoculation sous-cutanée de 1/2 c. c. de virus.

1. Des statistiques que nous avons faites à la Fourrière, il résulte que les chiens caniches sont noirs dans la proportion de 82 0/0 environ.

Une chèvre contaminée par la voie digestive, au moyen de spores du charbon de 25e passage, succombe après avoir présenté des symptômes de fièvre intense. On retrouve la bactéridie dans les organes : un volumineux œdème siégeant sur une anse intestinale et dans le mésentère marque la porte d'entrée du virus.

Résistance du virus de passage des chiens. — Sous sa forme filamenteuse, la bactéridie de passage résiste mal aux causes de destruction. Les spores perdent leur virulence lorsqu'on les conserve pendant un mois, dans le bouillon de culture, mis en tubes scellés et placés à l'abri de la lumière et à la température du laboratoire. Après deux mois de conservation, dans les mêmes conditions que précédemment, le sang charbonneux prélevé dans le cœur d'un chien qui vient de succomber peut encore donner des cultures virulentes pour le chien. Dans un cas où la conservation avait duré six mois, nous avons constaté que du sang charbonneux, riche en bactéridies sporulées, avait encore la propriété de féconder les milieux de culture, mais que ces cultures étaient dépourvues de virulence pour les chiens. Au point de vue de la résistance à la chaleur, le virus charbonneux de passage ne diffère pas du virus non exalté.

II

MORPHOLOGIE ET BIOLOGIE GÉNÉRALE DE LA BACTÉRIDIE DE PASSAGE DES CHIENS

La bactéridie, examinée dans le sang et dans les organes du chien qui a succombé au charbon de passage, a la forme d'un bâtonnet d'autant plus court et plus trapu que les passages de chien à chien ont été plus nombreux. Elle pousse bien sur les différents milieux de culture à 30-33°. Cultivée à 25°, la vitalité est toujours très grande, mais la virulence est amoindrie.

La bactéridie des premiers passages par le chien pousse bien dans les bouillons de viande et dans les solutions de peptone Chapoteaut. Elle donne des formes allongées qui se réunissent en amas floconneux caractéristiques. La bactéridie de 11e passage peuple rapidement les milieux liquides, mais les filaments qui naissent sont fragiles, et les segments de la bactéridie ont une tendance à se séparer, de sorte que l'aspect floconneux des cul-

tures tend à disparaître. La bactéridie des 13e-36e passages trouble les milieux liquides en 3 à 5 heures à 33°, et les cultures troubles ne s'éclaircissent qu'au bout de 6 à 8 jours. La forme filamenteuse a disparu, la bactéridie conserve la forme d'un bâtonnet court, de longueur un peu variable. Les bouillons de viande riche en glycogène (viande de cheval, viande de fœtus) perdent leur glycogène en quelques jours lorsqu'on les ensemence avec la bactéridie de passage. En 2 ou 3 jours, l'opalescence normale des bouillons fait place à une limpidité qui s'accentue de plus en plus, et la solution iodo-iodurée ne donne plus la réaction rouge violacée du glycogène [1].

La bactéridie de passage pousse bien sur la gélatine, qu'elle liquéfie lentement. Elle donne, sur gélose inclinée, des colonies dont l'aspect n'offre rien de particulier. Il est à remarquer que, sur gélose, la forme allongée est prédominante. Les bacilles courts retirés d'une culture trouble en milieu nutritif liquide, reportés sur gélose, donnent des amas de filaments bactéridiens enchevêtrés. Les cultures sur pomme de terre n'offrent aucune particularité digne d'être signalée. Le lait où pousse la bactéridie de passage de chien se coagule, et le coagulum se dissout au bout de 8 à 10 jours.

La bactéridie de passage donne des spores en présence de l'oxygène libre et à des températures comprises entre 16 et 42°. Les spores sont facilement colorables par la thionine phéniquée après plusieurs mordançages par la fuchsine anilinée.

III

LE CHARBON DE PASSAGE DES CHIENS AU POINT DE VUE DE LA SYMPTOMATOLOGIE ET DE L'ANATOMIE PATHOLOGIQUE

La maladie expérimentale débute par des frissons, une soif

1. Les cultures récentes faites en partant de la bactéridie de passage et en milieux nutritifs liquides retardent la cristallisation en modifiant la forme cristalline de l'alun. La face (*p*) du cube vient s'ajouter aux faces (*a'*) très réduites de l'octaèdre régulier et aux faces (*b'*) un peu plus développées du dodecaèdre rhomboïdal. Les bouillons non peuplés ne possèdent pas cette propriété. D'après les travaux de Lewalle et de Pasteur sur la cicatrisation des cristaux, il est permis de conclure que toute cause qui modifie le rapport des vitesses d'accroissement des cristaux suivant deux directions influe sur le choix des formes simples appelées à concourir à la délimitation du cristal (De Lapparent). L'introduction de matières étrangères solubles dans les eaux mères agit dans ce sens. De nouvelles recherches permettront peut-être de savoir à quelle substance soluble des cultures (ammoniaque, amine, acide...) il convient d'attribuer cette influence modificatrice de la cristallisation.

intense et un arrêt de la sécrétion des glandes cutanées du bout du nez. Au point d'inoculation apparaît un œdème sensible, d'autant moins volumineux qu'il est produit par une bactéridie ayant subi un plus grand nombre de passages par l'organisme du chien.

Pendant le cours de la maladie, le chien reste assoupi, sa force musculaire est amoindrie au point que les sujets les plus méchants n'opposent plus qu'une très faible résistance physique pendant les manipulations. Au cours de la période fébrile, la température peut atteindre 40°,5 et 41°, le pouls devient fréquent, la respiration difficile et la démarche vacillante.

Si la maladie dure 5 à 6 jours, il s'établit une diarrhée abondante, sanguinolente et inodore. Ce symptôme fait défaut quand la mort survient 24 à 30 heures après l'inoculation. L'urine émise est toujours abondante, quelquefois albumineuse et rarement sanglante.

L'amaigrissement des chiens inoculés du charbon de passage est toujours considérable.

Lorsque l'affection expérimentale dure 5 à 6 jours, la courbe thermique présente souvent 2 ou 3 ascensions qui sont l'indice de poussées fébriles successives. Chez les chiens qui résistent, outre qu'il existe de semblables variations thermiques pendant la période fébrile, il n'est pas rare d'observer, au moment où les sujets paraissent rétablis, de nouvelles ascensions brusques de la température ayant pour cause l'action d'un froid intense ou l'ingestion de grandes quantités de boisson. Les chiens qui succombent au charbon des 25 premiers passages présentent presque tous un abaissement considérable de la température vers les derniers moments de la vie. Leur température rectale tombe à 30°, 28° et même 26°. Les chiens inoculés avec la bactéridie des derniers passages (26e au 36e) ne présentent jamais d'hypothermie au moment de la mort. Leur température n'est pas inférieure à 38°,5.

Les lésions relevées à l'autopsie sont toujours hémorragiques. Les veines sous-cutanées sont gorgées de sang. Au point d'inoculation le tissu conjonctif est œdématié, l'œdème est rouge vers le centre et blanc à la périphérie, et les plans musculaires du voisinage sont décollés par des infiltrations abondantes. Le tissu musculaire est ferme et coloré en brun. Les ganglions

lymphatiques de la région inoculée sont infiltrés, succulents et hémorragiques.

On constate parfois des œdèmes à distance, en différents points du corps. Ces masses œdémateuses forment une gelée blanche légèrement hémorragique dans les parties profondes avoisinant les muscles de la région.

La muqueuse digestive au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle présente souvent, sur de larges surfaces, d'importantes hémorragies qui transforment le contenu intestinal et stomacal en une véritable boue sanguine. Le foie est friable, volumineux et de couleur foncée. La rate est ferme, son volume est rarement augmenté. Elle est parfois le siège de bosselures qui rappellent par leur forme et leur friabilité les bosselures que l'on observe quelquefois dans certains cas de rage. Les reins sont noirâtres, congestionnés, mais très rarement hémorragiques. Le sang est toujours poisseux, incoagulé ou mal coagulé.

On retrouve toujours la bactéridie dans les lésions. Elle est quelquefois en très faible quantité, mais dans la majorité des cas, elle se présente en amas considérables obstruant les capillaires. On réalise de belles préparations en colorant, par le Gram-Nicolle, les bactéridies qui obstruent les vaisseaux capillaires des villosités intestinales, du mésentère, de l'épiploon et du médiastin. Le médiastin inférieur convient de préférence parce qu'il présente peu de dépôts adipeux, même chez les chiens très gras. Les globules rouges du sang sont déformés, visqueux et agglutinés, les globules blancs polynucléaires existent en grand nombre dans le sang à côté des bactéridies.

La réaction phagocytaire est toujours très nette chez les chiens peu sensibles et chez les sujets qui ont reçu de fortes doses de sang virulent en inoculation sous-cutanée. Elle se traduit par l'englobement des bactéridies et par l'abondance des leucocytes au point d'inoculation. La réaction est faible lorsque l'infection charbonneuse évolue rapidement avec terminaison mortelle.

IV

CONCLUSIONS

— La phloridzine et le pyrogallol diminuent la résistance naturelle que le chien adulte oppose à l'infection charbonneuse expérimentale.

— L'organisme affaibli du chien enragé est très sensible à la bactéridie charbonneuse.

— Les chiens adultes peuvent succomber à l'inoculation sous-cutanée de virus charbonneux ayant passé par le bœuf.

— Après un seul passage par l'organisme du chien adulte enragé, la bactéridie se renforce suffisamment pour permettre les passages successifs de chien à chien. En passant par l'organisme du chien adulte normal, le virus charbonneux d'origine bovine exalte sa virulence et peut tuer les chiens dans des proportions assez considérables. Les passages successifs de chien à chien deviennent possibles, sinon toujours faciles, et procurent au bout de 30 à 36 passages une bactéridie donnant à tout coup la mort aux chiens de diverses races et de toutes tailles.

— La bactéridie renforcée par de nombreux passages à travers l'organisme du chien a subi des variations morphologiques ; elle est devenue plus courte, plus trapue, et ne donne plus de filaments allongés dans les milieux nutritifs liquides.

En terminant, nous nous faisons un devoir d'adresser nos chaleureux remerciements à nos maîtres, MM. Nocard et Roux, pour les excellents conseils et les précieuses indications qu'ils nous ont prodigués, et à notre chef de service, M. Duprez, pour l'extrême bienveillance qu'il nous a toujours témoignée en mettant à notre disposition de nombreux sujets d'expériences.

(*Travail du Laboratoire de la Fourrière.*)

RÉSUMÉ DE QUELQUES OBSERVATIONS

Obs. I. — Exp. n° 3. Chienne caniche, noire, 3 ans, 10kg,4, inoculée sous la peau le 1er décembre 1897 avec 5 c. c. de culture. Culture âgée de 5 jours, obtenue en ensemençant un bouillon de bœuf avec des traces de rate charbonneuse (vache saisie aux abattoirs de Villejuif.) — Les jours suivants, œdème au point d'inoculation, fièvre :

Températures..	38°,3	39,1	40	39,5	38,8	38,5
Dates.........	1er déc.	2	3	4	5	6

Le 6 décembre, l'animal paraissant se rétablir est de nouveau inoculé sous la peau avec 1 c. c. 1/2 de culture en bouillon, âgée de 4 jours. Cette culture avait été obtenue en ensemençant la rate d'un premier chien char-

bonneux, tué en 26 heures par inoculation sous-cutanée de 1 c. c. d'une émulsion de rate charbonneuse d'origine bovine. — Mort en 36 heures.

Autopsie : Œdème faible au point d'inoculation. — Rate ferme. — Nombreux bacilles dans le sang. — Tous les organes cultivent.

Obs. II. — Exp. n° 4. Chienne de rue, fauve, 3 ans, 10kg,9, présentant des symptômes non équivoques de rage, inoculée le 26 novembre 1897, avec 2 c. c. de bouillon charbonneux (charbon d'un mouton saisi aux Halles centrales). Inoculation sous-cutanée, à la face interne de la cuisse. Mort en 18 heures, avec léger œdème à la cuisse.

Autopsie : Œdème sanguinolent. — Sang incoagulé renfermant une dizaine de bactéridies par champ de microscope. — Rate noire, non friable. — Tous les organes ensemencés dans le bouillon donnent des cultures tuant les chiens dans la proportion de 71 0/0 et les cobayes en 30 heures.

Obs. III. — Exp. n° 42. Chien mouton, noir, vieux, 12kg,34, inoculé le 11 février 1898, dans les muscles de la cuisse, avec 4 gouttes de culture de 9me passage par le chien. Culture de 3 jours et bouillon peptone. Mort en 7 jours avec hypothermie.

Tres..	38°	39,3	38,8	38,2	39,6	39,2	40	34,9	31,3	28
Poids	12kg,34		12,00	11,60	11,60	11,20	10,75	10,55	10,25	10,25
Dates	11 fév.		12	13	14	15	16	17	18	
	9 h. 3' s.								9 h. m.	9 h. s. †

Les 15 et 16 février, vomissement et diarrhée. — Amaigrissement considérable.

Autopsie : Œdème volumineux. — Hémorragies dans les muscles au point d'inoculation. — Rate ferme. — Sang incoagulé pauvre en bactéridies. — Cultures floconneuses en bouillon.

Obs. IV. — Exp. n° 49. Chien caniche noir, 4 ans, 17kg,26, inoculé le 24 février 1898 dans les muscles, avec 2 gouttes de culture de 11e passage. Œdème volumineux. Diarrhée sanguinolente le 1er mars, mort le 2 mars.

Températures	37°9	40	40	38,1	39	39.8	38,3
Poids.......	17kg,25	16,80	16,30	16,15	15,37	14,75	14,50
Dates.......	24 fév.	25	26	27	28	1er mars	2 †

Autopsie : Hémorragies dans les muqueuses stomacale et intestinale. — Sang épanché dans le canal digestif. — Nombreux globules blancs polynucléaires dans le sang, Bactéridies rares. — Cultures riches.

Obs. V. — Exp. n° 51, 52, 53, 54. Quatre chiens inoculés sous la peau, le 3 mars 1898, avec de faibles doses de culture en bouillon (charbon de 12me passage).

a) Chien loulou, noir, vieux, 3kg,730, inoculé avec 1 goutte de bouillon de culture. Mort en 2 jours.

Autopsie : Tous les organes sont riches en bacilles charbonneux. — Cultures en bouillon se troublent après un séjour de 5 à 6 heures, à 32°.

b) Chien de rue, fauve, jeune (10 à 12 mois), 4kg,200, inoculé avec des traces de culture. Œdème. Fièvre passagère. — Appétit variable ainsi que l'indiquent les augmentations du poids qui ont suivi les déjeuners des 3, 4, 5, mars (95, 150, 250, 340gr.) L'animal se rétablit. Pendant le cours de la maladie, la courbe thermique montre trois légères poussées fébriles.

Températures.	38°,2	39,2	37,7	39.3	38,3	39,6	38,8	38,6	38,4
Dates	3 mars			4			5	6	7
	7 h. m.	7 h. s.	10 h. s.	8 h. m.	12 h. m.	8 h. s.			

c) Chien de rue, jaune, 6 mois, 3kg,8, inoculé avec 3 gouttes de culture. Fièvre intense. Quatre ascensions de la courbe thermique. Mort en 5 jours.

Tres..	38°,1	41,2	38,2	40,1	38,5	40,8	38,5	39,7	38,6	35,4	28,5	26	
Dates	3 mars.			4			5		6	7			
	7 h. s.	5 h. s.	10 h.s.	10 h. m.	3 h. s.	8 h. s.	12 h. m	8 h. s.	7 h. m.	7 h. m.	3 h. s.	10 h s.	†

Autopsie: Hémorragies intestinales. — Sang incoagulé. — Bacilles nombreux dans le sang. — Rate ferme et de volume normal. — Cultures et bouillon troubles après quelques heure de séjour à l'étuve à 33°.

d) Chien griffon, fauve, 1 an 1/2, 3kg,975, inoculé avec 2 gouttes de culture. Mort en 5 jours. Œdème très sensible. Trois ascensions de la courbe thermique.

Tres..	38°,4	40,9	39	39,9	39,1	40	38,6	39,8	38,5	34,2
Dates	3 mars		4		5			6	7	
	7 h. m.	7 h. s,	2 h. s.	8 h. s.	7 h. m.	12 h. m.	5 h. s.	8 h. m.	7 h. m.	5 h. s. min. †

Autopsie : Œdème faible. — Muqueuse digestive indemne de congestion. — Sang incoagulé pauvre en bactéridies. — Cultures troubles en milieu liquide.

Obs. VI. — Exp. n° 56. Chien noir, extrémités blanches, âgé d'un jour, inoculé le 4 mars 1898, 11 heures du matin, avec des traces de culture de 12e passage. Mort le lendemain.

Températures	31°	28	24,5	23	22	18	12	11,5	
Dates	4 mars		5						
	11 h m.	4 h. s.	10 h. m.	11 h. m.	12 h m.	1 h. s,	2 h. 1 1 s.	†	

Autopsie : Nombreux bacilles dans le sang. — Organes congestionnés. — Œdème faible. — Cultures troubles en bouillon.

Obs. VII. — Exp. n° 80. Chien de rue, 4 ans, 3kg,690, inoculé dans le muscle avec 2 c. c. de culture. (Bouillon charbonneux récent du 22e passage). Mort en 50 heures.

Tempres.	38°,5	39,4	40	40,9	40,8	40,7	39,6	39	
Poids...	3kg,690	3,577		3,470		3,470	3,390	3,400	
Dates ...	21 oct.	22					23		†
	3 h. s.	9 h. m	11 h. m.	1 h. s.	3 h. s.	5 h. s.	7 h. m.	11 h. m.	5 h. s.

Autopsie : Hémorragies intestinales. — Bacilles charbonneux nombreux dans le sang et dans le contenu de l'intestin. — Le cobaye inoculé avec des traces du contenu intestinal meurt du charbon en 36 heures. — Cultures troubles en milieu nutritif liquide.

Obs. VIII. — Exp. n° 97. Chienne de rue, blanche, 4 ans, 6kg,575, en état de gestation, inoculée sous la peau avec 6 gouttes de culture de 23e passage. Mort en 2 jours 1/2. Fièvre. Vomissements verdâtres. Deux poussées fébriles très marquées.

Tempres.	37°,5	38,5	40,8	40,1	38,3	39,8	38,7	37,5
Poids...	6kg,576		6,650			6.080		5,960
Dates ...	31 oct.		1er nov.			2		
	9 h m.	5 h. s.	8 h m.	11 h m.	3 h. s.	9 h. m.	1 h. s.	9 h. s †

Autopsie : Sang poisseux. — Œdème abondant. — Rate ferme. — Urine albumineuse. — Nombreux globules blancs polynucléaires dans le sang de la mère, nombreux mononucléaires dans le sang des fœtus.

Obs. IX. — Exp. n° 100. Chien de berger, noir et blanc, 3 ans, 9kg,25, soumis à l'action de 2 grammes de phloridzine le 2 novembre 1898. Inoculé le 3 novembre, sous la peau, avec 1/2 c. c. de bouillon (culture de 25e passage). Le 3 novembre, l'urine du chien était riche en glucose. Mort en 30 heures.

Tempres.	38°,3	39	40,2	38,8	38	38,5	39	39,7	
Dates...	2 nov.	3				4			
	Midi	midi	2 h. s.	4 h. s.	6 h. s.	6 h. m.	10 h. m.	8 h. s.	†

Autopsie : Œdème faible. — Hémorragies stomacales abondantes. — Nombreux bacilles dans le sang.

Obs. X. — Exp. n° 111. Chien mouton, noir cendré, adulte, 13 kilogrammes, inoculé dans les muscles de la cuisse avec 1/4 c. c. d'une émulsion de rate (chien charbonneux de 26e passage). Mort en 52 heures.

Températures.	38°	38,7	38,2	38,5	37,9	39
Dates.........	9 nov.		10		11	†
	m.	s.	m.	s.	m.	s.

Autopsie : Sang incoagulé, riche en bactéridies. — Rate noire et molle. — 3 gouttes d'une émulsion de rate tuent un pigeon en 3 jours.

Obs. XI. — Exp. n° 123. Chienne de rue, fauve, 8kg,750, inoculée sous la peau, le 19 novembre 1898, avec 5 c. c. de sang (chien charbonneux 30e passage). Mort en 48 heures.

Autopsie : Rate molle, très riche en bacilles. — Sang noir incoagulé. — Lait charbonneux : 5 à 10 bactéridies par champ de microscope. — Cultures troubles en milieu nutritif liquide.

Obs. XII. — Exp. n° 101. Chienne de berger, noire, 7kg,42, inoculée le 29 octobre 1898, avec 5 gouttes de culture récente (bouillon charbonneux de 23e passage). Fièvre passagère. L'animal résiste.

Tres..	38°	38,1	39,3	37,9	37,5	38,5	39,5	39,6	38,9	38,9	39
Dates.	29 oct.		30				31		1er nov.	2	3
	11 h. m.	5 h. s.	7 h. m.	9 h. m.	11 h. m.	8 h. s.	7 h. m.	2 h. s.			9 h. m.

Le 3 novembre, l'animal ingère une grande quantité d'eau ; il est pris de tremblements, il a de la fièvre.

Températures	39°,6	39,6	40	39,5
Dates.......	3 nov.			
	12 h. m.	2 h. s.	4 h. s.	6 h. s

Les jours suivants la température redevient normale. Le 7 novembre, une injection de culture charbonneuse détermine une fièvre passagère. L'animal résiste. Il est immunisé.

RECHERCHES

SUR

L'influence de l'azote nitrique et de l'azote ammoniacal

SUR LE DÉVELOPPEMENT DU MAIS

Par M. P. Mazé, Préparateur a l'Institut Pasteur.

I

L'usage rationnel des engrais chimiques permet-il au cultivateur d'avoir la haute main sur le rendement de ses récoltes? Cette prétention est combattue par un si grand nombre de facteurs, qu'elle doit être émise avec beaucoup de réserves. Indépendamment des conditions d'humidité, de température, d'intensité lumineuse sur lesquelles on ne peut rien, notre ignorance sur la physiologie de la nutrition des végétaux entraîne un certain nombre d'aléas avec lesquels il faut aussi compter.

On sait grossièrement quels sont les éléments principaux qui interviennent dans l'alimentation de la plante ; mais on sait peu de choses des influences diverses tenant à la nature des composés dans lesquels ils sont engagés. Un même élément agit de façon différente suivant les états sous lesquels il se présente. L'azote, suivant qu'il est fourni à l'état d'ammoniaque ou d'acide nitrique, ne conduit pas au même résultat dans un sol donné.

Je me suis proposé dans ce travail de rechercher les causes encore mal connues de cette divergence.

De longues et nombreuses recherches ont montré que l'azote nitrique semble généralement le plus efficace.

MM. Lawes et Gilbert ont cultivé du blé depuis l'année 1844 jusqu'à ces dernières années, sur un même terrain, dans des parcelles qui recevaient des engrais minéraux et du sulfate d'ammonium ou du nitrate de sodium. Voici les rendements moyens obtenus à l'hectare durant cette longue série d'expériences.

Engrais fournis à l'hectare.	Poids du grain.	Poids de la paille.
—	—	—
	kgr.	kgr.
Engrais minéraux seuls	1007,048	1.639
— + 48 kgr. azote (sous f. d'ammonium).	1615,224	2.813
— + 96 kgr. —	2192,568	4.223
— + 144 kgr. —	2413,88	5.076
— + 96 kgr. azote nitrique	2426,928	5.250

M. Dehérain a obtenu des résultats analogues non seulement avec le blé, mais aussi avec la betterave, la pomme de terre, le maïs fourrage.

A quoi tient cette infériorité de l'azote ammoniacal sur l'azote nitrique? Les raisons en doivent être multiples; elles peuvent tenir au sol ou au végétal.

En ce qui concerne le sol, M. Dehérain recommande d'employer le sulfate d'ammonium dans les terres fortes, humides, et de réserver les nitrates pour les sols légers et secs.

Mais la plante ne doit pas être indifférente non plus; on ne tient pas suffisamment compte peut-être de sa qualité d'être vivant qui a ses préférences et qui semble les manifester pour l'azote nitrique. On ne s'est pas demandé si l'azote ammoniacal exerce sur elle une influence nocive à la dose où on l'emploie couramment. Cette question a son importance; elle vient tout naturellement à l'esprit et voici pourquoi : on sait que l'ammoniaque incorporée au sol soit en nature, soit à l'état de sel, se nitrifie rapidement. Il est donc possible qu'une culture qui a reçu de l'azote ammoniacal ne l'utilise que lorsqu'il est nitrifié. Si le sel ammoniacal est doué de propriétés nocives vis-à-vis de la plante, on comprend qu'il puisse paralyser son développement, moins dans les terres fortes qui en immobilisent une certaine quantité, que dans les sols légers qui en fixent beaucoup moins.

On conçoit aussi que les composés ammoniacaux, tout en étant assimilables, demandent cependant à être employés à des doses modérées, parce que la plante ne peut pas les supporter à haute dose.

Les hypothèses susceptibles d'être invoquées pour expliquer les résultats observés ne manquent pas, comme on le voit.

L'expérience décidera entre elles.

II

LE MAÏS ASSIMILE L'AMMONIAQUE EN NATURE

La première question à résoudre est celle de l'assimilabilité des sels ammoniacaux. Elle a déjà été résolue dans le sens de l'affirmative par M. Schlœsing. Ce savant a montré en effet que le gaz ammoniac, répandu dans une atmosphère confinée où végétaient des plants de tabac, contribuait à leur développement. Le gaz ammoniac fixé par les organes aériens avait donc été assimilé.

En est-il de même des sels ammoniacaux offerts aux organes souterrains? L'observation de M. Schlœsing ne permet pas de l'affirmer *a priori*.

M. Müntz a étudié directement la question. Pour la résoudre, il faut se mettre à l'abri des ferments nitrifiants.

Dans ce but, M. Müntz prend de la terre de jardin privée de nitrates par des lavages, et additionnée de sulfate d'ammonium; il la place dans des pots qu'il expose dans une étuve à 100°. Cette température est suffisante pour tuer les ferments nitriques.

Pour éviter la contamination des germes de l'air pendant la durée de l'expérience. il recouvre les pots de grandes cages dont quelques parois sont vitrées, tandis que les autres sont formées de toiles métalliques enduites de glycérine; celles-ci laissent diffuser l'air tout en interceptant les poussières atmosphériques.

Les graines sont débarrassées des ferments nitriques par une courte immersion dans l'eau bouillante.

De cette manière, M. Müntz a constaté que le maïs, la fève, la féverole, l'orge, le chanvre se développent à peu près normalement en utilisant les sels ammoniacaux qui leur sont offerts.

Pour vérifier si elles n'avaient pas absorbé de nitrates formés dans le cours de la végétation, on recherchait l'acide nitrique dans la terre à la fin de l'expérience. De leur absence à ce moment on concluait qu'il ne s'en était pas formé auparavant. D'autre part, des pots témoins placés dans les mêmes conditions et n'ayant pas reçu de graines avaient été stérilisés; quelques-uns étaient additionnés d'un peu de terre nitrifiante; les autres n'en recevaient pas; ceux-ci ne renfermaient pas de nitrate à la fin de l'expérience; ceux-là, au contraire, étaient devenus le siège d'une nitrification assez active.

On peut, en se montrant un peu exigeant, faire à cette expérience une objection sérieuse.

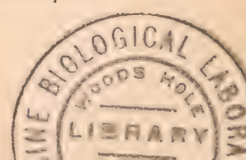
L'absence de nitrates dans les vases, à la fin de la culture, ne permet pas de conclure d'une façon rigoureuse que les ferments nitrifiants ne les avaient pas envahis. Pour donner à cette déduction toute la certitude qu'elle doit avoir, il eût fallu conserver les vases quelque temps après la récolte. L'acide nitrique se serait ainsi accumulé dans la terre, et on aurait pu le caractériser facilement. Cette précaution n'ayant pas été prise, on est en droit de se demander s'il ne s'en est pas formé, par exemple, dans le voisinage des racines, et s'il n'a pas été absorbé au fur et à mesure.

J'ai donc repris cette expérience, car il est tout à fait indispensable de bien établir l'assimilation des sels ammoniacaux pour arriver au but que je me suis proposé.

J'ai accordé la préférence aux milieux liquides ; ce choix n'est pas sans inconvénient ; un grand nombre de plantes supportent mal les solutions nutritives ; les graminées seules, parmi les plantes culturales, n'en souffrent nullement. Parmi celles-ci, j'ai pris le maïs qui se prête bien aux exigences de l'expérimentation.

J'ai eu recours aux procédés de stérilisation et de germination que j'ai déjà décrits dans ces *Annales*, février 1897. Lorsque les tiges avaient atteint 15 à 20 centimètres de longueur, je les plaçais dans des flacons à col étranglé muni d'un fort tampon de coton ; ces flacons, d'une contenance de deux et trois litres, étaient remplis d'une solution nutritive préalablement stérilisée à 120° ; ils portaient en outre une petite tubulure latérale fermée avec du coton, qui permettait d'introduire de l'eau distillée stérile, sans toucher à la fermeture principale.

A la fin de l'expérience, on peut vérifier facilement si les microbes ont pris possession des milieux de culture ; mais lorsque les tubes de géloses, de gélatines ou de bouillons, ensemencés avec une goutte de la solution nutritive, demeurent stériles, on ne peut pas en conclure que les ferments nitrifiants sont absents, puisqu'ils ne poussent pas sur ces milieux. C'est pour cela qu'après avoir retiré avec précaution les plantes des flacons, on les rebouche et on les conserve quelques semaines pour voir si l'ammoniaque ne se transforme pas en acide nitrique.



De plus, comme mon but est de comparer la valeur nutritive de l'azote ammoniacal et de l'azote nitrique, j'ai fait en même temps des cultures dans des solutions additionnées de nitrate de sodium.

Voici la composition de la solution minérale que j'ai employée:

Eau distillée	1000 gr.
Nitraté de sodium ou sulf. d'ammonium.	Quantités variables.
Phosphate de potassium	1
Carbonate de calcium	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate ferreux	0,1
Chlorure de manganèse	0,1
Chlorure de zinc	traces.
Silicate de potassium	traces.

Dans les solutions ammoniacales, on ajoutait en outre 0,1 pour 1,000 de chlorure de sodium.

Le tableau suivant résume les résultats obtenus dans une expérience:

I. AZOTE NITRIQUE.

Nos d'ordre.	Nitrate de sodium p. 1000.	Durée de l'expérience.	Poids sec des plantes. mgr.	Azote pris au nitrate mgr.
	1	44 j.	8.900	279,8
2	1	45	8.910	261
3	0,5	32	5.710	181,9
4	0,5	36	6.261	212,1

II. AZOTE AMMONIACAL.

	Sulfate d'ammonium. p. 1000.			Azote pris à l'ammoniaque. mgr.
5	1	44	6.625	232,5
6	1	39	5.135	189,3
7	0.5	47	8.640	265,6
8	0.5	30	6.370	231.54

Les solutions ammoniacales renfermaient encore de l'ammoniaque ; on les a conservées deux mois au laboratoire. Au bout de ce temps, elles donnaient la réaction de Nessler aussi nette que lorsqu'on a arrêté la végétation du maïs, tandis qu'elles ne présentaient aucune coloration au sulfate de diphénylamine ou au réactif sulfophéniqué.

L'ammoniaque a donc été absorbée en nature, ce qui est d'accord avec les résultats obtenus par M. Müntz.

L'ammoniaque est donc un aliment pour le maïs; on peut même ajouter qu'elle s'est montrée aussi efficace que l'acide nitrique. De plus, le développement de ces plantes en liquide minéral ne le cède en rien à celui qu'on observe chez la même espèce végétale lorsqu'elle pousse dans les sols les plus fertiles.

Si on examine les chiffres de la quatrième colonne, on est cependant surpris de constater que les n°s 5 et 6 présentent un retard relativement énorme sur les n°s 7 et 8. Les plantes nourries avec de l'azote nitrique ne présentent pas cette particularité. Chez elles, le développement est à peu près proportionnel au temps.

Il est donc permis de se demander si le sulfate d'ammonium, à la dose de 1 pour 1,000, n'exerce pas une influence nocive sur la plante. Cette idée découle non seulement de l'examen du poids sec des plantes, mais aussi de l'aspect macroscopique de leurs organes.

Les tiges et les feuilles ne trahissent aucun signe de souffrance si on les compare aux plantes qui ont reçu du nitrate de sodium ; mais il n'en est pas de même des organes souterrains. Déjà à la concentration de 0,5 pour 1000 de sulfate d'ammonium, l'aspect des racines diffère très sensiblement de celui qu'elles présentent dans les solutions nitriques. A 1 pour 1,000, leur allure devient si caractéristique que l'œil le moins prévenu s'en trouve frappé.

Dans les milieux additionnés de nitrate de sodium, elles sont longues, flexibles ; les racines adventives portent des ramifications aussi longues que l'axe principal ; leur ensemble remplit tout le volume du flacon d'un lacis extrêmement serré.

Dans le sulfate d'ammonium, les racines adventives sont très fortes, rigides; mais elles s'allongent peu ; leurs extrémités atteignent rarement le fond du flacon ; les ramifications sont nombreuses, mais elles restent courtes ; les plus anciennes sont les plus longues ; les plus rapprochées des extrémités ressemblent à des petits tubercules ; toutes sont implantées perpendiculairement à l'axe et se maintiennent horizontalement dans le liquide. Cet aspect montre d'une façon frappante que la plante tend à réduire le plus possible la surface d'absorption de son système radiculaire.

Avant de tirer de ces observations toutes les conclusions

qu'elles comportent, voyons d'abord comment se conduisent les plantes lorsqu'on leur offre dans une même solution l'azote sous les deux états.

III

CULTURE DU MAÏS DANS DES SOLUTIONS MINÉRALES RENFERMANT DE L'AZOTE NITRIQUE ET DE L'AZOTE AMMONIACAL

L'azote nitrique a été offert à l'état de nitrate de sodium ; l'azote ammoniacal sous forme de sulfate d'ammonium.

Les lois des échanges mutuels entre divers sels en présence n'ont pas permis à ces composés de conserver leur état primitif. C'est la présence du carbonate de calcium à 2 pour 1,000 qui règle l'équilibre chimique de la solution nutritive. La chaux précipite toutes les bases terreuses à l'état d'hydrates ou de carbonates. L'ammoniaque se retrouve aussi dans la solution à l'état de carbonate. La potasse, la soude, la chaux et la magnésie se partagent les acides sulfurique, chlorhydrique et azotique.

L'ammoniaque et l'acide nitrique étant retenus dans deux molécules différentes, on doit se demander si ces deux corps ne réagissent pas l'un sur l'autre en provoquant une déperdition d'azote.

Le carbonate d'ammonium, porté à une température de 120°, peut donner lieu à un dégagement d'ammoniaque.

Les nitrates enfin, en présence d'un composé ferreux, peuvent donner naissance à des composés de l'azote moins oxygénés et par suite plus capables de réagir sur l'ammoniaque pendant leur passage à l'autoclave.

Ces causes possibles de déperdition d'azote ne peuvent pas évidemment appauvrir beaucoup des solutions aussi étendues que celles que j'ai employées. Mais il faut élucider ce point.

La solution minérale de la page 30 a été additionnée :

1° De 2 pour 1,000 de nitrate de sodium et 1 pour 1,000 de sulfate d'ammonium ;

2° De 2 pour 1,000 de sulfate d'ammonium ;

3° De 2 pour 1,000 de nitrate de sodium et de 0,2 pour 1,000 de sulfate ferreux.

Après stérilisation à 120°, on a retrouvé dans la première solution 211^{mgr}.8 d'azote ammoniacal sur 212^{mgr},12 ; l'azote

nitrique qu'elle renfermait dans 100 c. c. ramenés au bain-marie à 5 c. c., a donné 55 c. c. 5 de bioxyde d'azote; le volume de bioxyde d'azote fourni par 5 c. c. d'une solution à 5 pour 100 de nitrate de sodium étant 69 c. c. 5, on trouve par le calcul que l'azote nitrique introduit dans 100 c. c. de la solution minérale correspond à un volume de 55 c. c. 6 de bioxyde.

La deuxième solution renfermait après stérilisation 64^mgr^,03 d'azote ammoniacal sur 63^mgr^,63 d'azote initial.

La troisième enfin a donné 84 c. c. 25 de bioxyde d'azote pour 150 c. c. de solution ramenés à 5 c. c., le chiffre calculé, d'après le témoin, étant 83 c. c. 4.

Tous ces résultats montrent que des solutions minérales renfermant de l'azote nitrique et de l'azote ammoniacal, ou les deux à la fois, à une concentration plus forte que celles dont j'ai fait usage pour les cultures, ne s'appauvrissent pas pendant le passage à l'autoclave[1].

Ceci étant établi, voici les chiffres fournis par des cultures de maïs effectuées dans un milieu renfermant de l'azote nitrique et de l'azote ammoniacal, sa teneur en éléments minéraux autres que les composés azotés étant la même que celle de la solution précédemment employée.

Nos	Vol. de la sol.	AZOTE FOURNI. Sulf. d'amm. p. 1000.	Nitr. de sod. p. 1000.	Rapp. initial de l'az. amm. à l'az. nit.	AZOTE RESTANT. Amm. mgr.	Nitr. mgr.	Rapp. final.	Poids des plantes	Durée de l'exp.
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2.500 c.c.	0,5	0,5	1,293	136,4	103	1,314	4.889	30 jours.
II	1.850	0,75	1	0,965	177	189	0,963	3.932	41 jours.
III	id.	0,5	1	0,643	0	48,2	»	10.700	id.
IV	id.	0,2	1	0,257	0	24,1	»	8.532	id.

Les chiffres des colonnes 6, 7 et 8 méritent d'être signalés. Pour les plantes nos I et II, l'absorption de l'azote ammoniacal et

1. Ce point établi, on peut se proposer de faire à la fin de l'expérience le bilan de l'azote fourni aux plantes. Voici quelques analyses faites dans ce but :

Azote fourni nature.		Poids en mgr.	Poids des plantes. mgr.	Azote dans les plantes. mgr.	Azote dans le liquide nutritif. Nitrique. mgr.	Ammoniacal. mgr.	Organique. mgr.	Total de l'azote retrouvé. mgr.
—		—	—	—	—	—	—	—
Nitrate de sodium.	1gr,25	205	6.261	212,1	0	0	4	216,1
—	1gr,25	205	12.068	213,8	0	0	3,7	217,5
Sulfate d'amm...	1gr,25	265,15	8.118	266,9	0	4,6	4,1	275,6
Nitrate de sodium. / Sulfate d'amm...	1gr,25 / 0gr,5	347,4	13.978	352,5	0	0	5,3	357,8

de l'azote nitrique a été à peu près proportionnelle à la concentration initiale, puisque les rapports 1,314 et 0,933 sont très voisins respectivement de 1,293 et 0,965. A côté de cela il est curieux de constater que l'ammoniaque a été complètement absorbée dans les n°s III et IV, pendant que l'azote nitrique reste encore dans la liqueur en quantité notable.

Remarquons encore que le poids de plante élaboré dans le même temps diminue rapidement lorsque la dose d'ammoniaque à l'état de sulfate dépasse 0,5 pour 1,000. Les plantes périssent dans les solutions renfermant 1 pour 1,000 de nitrate de sodium et 1 pour 1,000 de sulfate d'ammonium.

Une deuxième série d'expériences a été faite avec des solutions nutritives dans lesquelles on faisait varier la nature des acides combinés à l'ammoniaque et des bases unies à l'acide nitrique.

Les sels ammoniacaux utilisés sont : le sulfate et le chlorure : comme nitrates on a pris les nitrates de potassium et de sodium. Ces composés ont été associés deux à deux, mais de manière seulement à obtenir des liqueurs renfermant l'azote sous les deux états.

Cela fait en tout quatre solutions renfermant :

S_1	Sulfate d'ammonium............	0,5 p. 1000.
	Nitrate de sodium	1 —
S_2	Sulfate d'ammonium............	0,5
	Nitrate de potassium............	Poids équivalent à 0,5 de nitrate de sodium.
S_3	Chlorure d'ammonium..........	Poids équivalent à 0,5 de sulfate d'ammonium.
	Nitrate de Sodium..............	0,5
S_4	Chlorure d'ammonium..........	Poids équivalent à 0,5 de sulfate d'ammonium.
	Nitrate de potassium	Poids équivalent à 0,5 de nitrate de sodium.

Les solutions S_3 et S_4 renfermant du chlorure d'ammonium ont la composition suivante :

. Si l'on considère que la quantité d'azote apporté par la graine oscille autour de 10 mgr., on voit que l'on retrouve à la fin de l'expérience tout l'azote introduit dans les solutions nutritives, ce qui est d'accord avec les nombreuses observations faites déjà dans ce sens.

Le procédé d'expérimentation que j'ai adopté se prêtait très bien également de la détermination du volume d'eau employé par la plante pour fabriquer 1 kgr. de poids sec. Voici les résultats obtenus avec quelques pieds de maïs pris au hasard dans plusieurs séries d'expériences.

Eau distillée	1000
Phosphate de potassium	1
Chlorure d'ammonium	0,5
Nitrate { sodium ou potassium	0,5 quantité équivalente
Carbonate de calcium	2
Sulfate de magnésium	0,2
— ferreux	0,1
— de manganèse	0,1
— de zinc	traces
Silicate de potassium	traces

Les solutions S_1 et S_2 ne sont autres que la solution dont on a vu la composition à la page 30.

Voici maintenant les relations entre les quantités d'azote absorbé ou laissé dans les solutions par les plantes prises très jeunes, ainsi que l'indique leur poids.

Solutions	Rapport initial de l'azote ammoniacal de l'azote nitrique.	Rapport final.	Rapport de l'azote ammoniacal à l'azote nitrique absorbés.	Poids sec des plantes.
S_1 1850 cc.	0,643	0,440	1,47	2850 mgr.
S_2 2500	1,293	0,628	3,16	4955
S_3 2500	1,293	1,084	1,81	3078
S_4 2500	1,293	0,678	2,86	4733

Ces chiffres montrent que l'azote ammoniacal est l'objet d'une préférence marquée de la part de la plante. C'est un résultat qu'il faut accepter ; il me paraît impossible de l'expliquer ni même de l'interpréter. On peut supposer, à la rigueur, qu'une liqueur renfermant un même nombre de molécules de carbonate d'ammonium et de nitrates alcalins et alcalino-terreux cède à la plante deux fois plus d'azote ammoniacal que d'azote nitrique, si l'absorption suit à peu près les lois de l'osmose.

Pour un même poids de sulfate d'ammonium et de nitrate de sodium entrant dans la constitution de la solution nutritive, le nombre des molécules des deux composés est dans le rapport inverse des poids moléculaires. Le rapport du nombre de molé-

	Poids des plantes. mgr.	Eau évaporée. Litres.	Pour 1 kgr. de poids sec. Litres.
1	4.889	0,612	142
2	6.370	0,805	126
3	6.261	1,012	161
4	9.248	1,235	133
5	12.880	2,350	182

Ces chiffres sont plus faibles que ceux qui ont été obtenus par d'autres expérimentateurs ; cela tient à ce qu'ils ne s'étendent qu'à une phase restreinte de l'évolution de la plante.

cules de sulfate d'ammonium au nombre de molécules de nitrate de sodium dans la solution est donc $\frac{85}{132}$; la molécule de sulfate renfermant deux atomes d'azote, le rapport de l'azote ammoniacal à l'azote nitrique absorbé devrait être voisin du chiffre $\frac{85 \times 2}{132} = 1,29$; les rapports trouvés lui sont tous supérieurs, même dans la solution S_1 où il aurait dû être égal à $\frac{85 \times 2}{132 \times 2} = 0,64$.

C'est évidemment la composition du milieu qui intervient dans ces résultats, puisque les plantes n^{os} I et II du tableau page 33 indiquent que, dans certains cas, c'est l'azote nitrique qui est consommé de préférence. Tout cela montre que le problème de la nutrition végétale est fort complexe, et que sa solution dépend d'un grand nombre de facteurs encore complètement inconnus.

Ce qu'il faut retenir pour le moment, c'est que l'ammoniaque n'est nullement inférieure à l'acide nitrique au point de vue des exigences alimentaires du maïs.

L'expérience suivante montre d'autre part que, pour une même quantité d'azote prise à l'état d'ammoniaque ou d'acide nitrique, le poids sec élaboré par le maïs est à peu près le même dans le même temps. Ce résultat découle déjà des chiffres consignés dans le tableau de la page 30. Mais il est utile de l'établir directement.

Pour cela j'ai pris dans une même série de plantes deux pieds de maïs, l'un végétant dans une solution minérale à 0,5 pour 1,000 de sulfate d'ammonium, l'autre dans une solution nitrique à 0,5 pour 1,000 de nitrate de sodium. On les laisse pousser jusqu'à ce que les feuilles inférieures commencent à jaunir; c'est un signe que les aliments font défaut et que la plante s'autophagie; mais cette particularité ne s'observe que longtemps après que la solution nutritive a cédé tout son azote à la plante [1]. Voici les résultats obtenus :

Nature de l'azote fourni.	Quantité mgr.	Poids du végétal à l'état sec.	Azote p. 100.	Poids sec élaboré pour 1 d'azote.
N° 1 ammoniaque...	265,15	16,330	1,68	61,62
N° 2 acide nitrique..	205	12,068	1,77	58,86

1. Ainsi, si l'on se reporte au tableau de la page 30, on remarque que le n° 4, qui a reçu 205 milligrammes d'azote nitrique et qui par conséquent a épuisé à peu près la liqueur nutritive, renferme 3,38 pour 100 d'azote; le n° 7 qui a reçu 265^{mgr},15 d'azote ammoniacal présente une teneur de 3,08 pour 100 d'azote. En vivant sur cette réserve, ces plantes peuvent doubler leurs poids sec à peu près. Au point de vue pratique ces résultats présentent un grand intérêt. Ils montrent

On voit que ces chiffres sont à peu près du même ordre. La légère différence qu'ils dénotent en faveur de l'ammoniaque doit être mise sur le compte de l'impossibilité de saisir le moment précis où la pénurie d'azote commence à se faire sentir. Ce résultat montre en outre que l'oxygène de l'acide nitrique ne semble pas appelé à jouer un rôle utile dans le développement du maïs.

IV

RECHERCHE DES DOSES OPTIMA DE SULFATE D'AMMONIUM ET DE NITRATE DE SODIUM A EMPLOYER

Les faits consignés dans les chapitres précédents indiquent que le maïs n'établit pas de différence entre l'azote ammoniacal et l'azote nitrique; cette conclusion n'est cependant vraie que sous certaines réserves que j'ai déjà faites dès la page 31.

Lorsque la concentration de la liqueur minérale en sulfate d'ammonium dépasse 0,5 pour 1,000, on constate un ralentissement dans le développement de la plante et une modification de l'appareil radiculaire, sensible à 0,5 pour 1,000, très frappante à 1 pour 1,000 et au-dessus.

Les solutions additionnées de nitrates n'exercent pas cette influence sur le végétal: elles ne provoquent pas non plus de retard dans son développement lorsque la concentration en nitrate est inférieure à 2 pour 1,000.

C'est cette différence d'action liée aux doses d'azote employées sous l'une ou l'autre forme qu'il faut maintenant examiner.

Voyons d'abord comment se comportent les graines en voie de germination, en présence de solutions minérales de concentration convenable, ou d'eau distillée additionnée d'azote ammoniacal ou nitrique.

La solution minérale que j'ai employée est la suivante :

Eau distillée	1000 grammes.
Phosphate de potassium	1
Sulfate de potassium	0,5
Carbonate de calcium	2
Sulfate de magnésium	0,2
Chlorure de calcium	traces
Chlorure de zinc	traces
Sulfate de fer	traces
Chlorure de manganèse	traces

que des fourrages récoltés sur divers terrains possèdent, à poids égal, une valeur

Avec cette solution on a préparé trois milieux :

N° 1. Solution minérale seule.
N° 2. — — avec 1 p. 1000 de nitrate de sodium.
N° 3. — — avec 1 p. 1000 de sulfate d'ammonium.

L'eau distillée a servi à préparer trois autres milieux :

N° 4. Eau distillée seule.
N° 5. — — avec 1 p. 1000 de nitrate de sodium.
N° 6. — — avec 1 p. 1000 de sulfate d'ammonium.

Les essais de germination ont porté sur le haricot, le maïs, la vesce de Narbonne; ils ont été effectués dans des tubes à essai renfermant 20 c. c. de liquide; ces tubes étaient stérilisés à 120°; chacun d'eux recevait une graine également stérilisée.

Ces essais ont permis de constater que les milieux n°s 1, 2, 3 et 4 sont également favorables à la germination des trois espèces de graines dont je me suis servi. Avec les milieux 5 et 6 on observait un retard sensible sur les précédents; néanmoins, les plantules ne trahissaient aucun signe apparent de souffrance.

Cette expérience montre, en somme, que les graines germent normalement dans de l'eau distillée comme dans des solutions minérales dont la concentration est, dans une certaine mesure, comparable à celle de l'eau qui circule dans les interstices du sol arable. Les résultats obtenus avec les solutions 5 et 6 semblent établir, en outre, qu'une solution minérale n'exerce d'influence retardatrice sur le développement de la plantule, qu'autant qu'elle réalise certaines conditions de composition que je n'ai pas essayé de préciser davantage.

Au point de vue pratique on peut s'en tenir à ces résultats. Les terres les plus riches ne cèdent pas à l'eau qui les imprègne autant de sels solubles qu'en renferment les solutions n°s 2 et 3. La marche de la germination des graines dans le sol doit se confondre avec celle que nous avons observée dans les liquides minéraux.

Au point de vue physiologique il est intéressant d'observer la germination dans des liqueurs plus riches en azote.

On a donc préparé un volume convenable de la solution page 30, que nous appellerons SP.

nutritive qui peut varier du simple au triple, suivant la fertilité du sol, car toutes les plantes du tableau page 30 renferment 3 à 4 pour 100 d'azote; la teneur des plantes de la page 35 dépasse même 5 pour 100.

On l'a additionnée : 1° de 3, 4 et 5 pour 1,000 de nitrate de sodium; on a ainsi obtenu trois milieux : O_3, O_4, O_5; la solution SP. additionnée d'autre part de 3, 4 et 5 pour 1,000 de sulfate d'ammonium, a fourni trois autres liqueurs : H_3, H_4, H_5.

Avec la solution SP employée seule et l'eau distillée prises pour termes de comparaison, cela fait en tout 8 milieux de culture. Ils ont été répartis dans des tubes de 35 centimètres de long sur 3 centimètres de diamètre, à raison de 25 c. c. par tube. On a stérilisé ceux-ci à 120°, et dans chacun d'eux on a mis à germer 1 grain de maïs. On a ainsi réparti :

Dans l'eau distillée	ED	8 graines.
Dans la solution...	SP	10
	O_3	10
	O_4	10
	O_5	10
	H_3	10
	H_4	10
	H_5	9

La germination s'est effectuée à la température de 24-25°. Le tableau suivant résume l'exposé de sa marche.

Solutions	ED	SP	O_3	O_4	O_5	H_3	H_4	H_5	Observations.
			État des graines après 4 jours de germination.						
Graines germées.......	8	6	7	6	6	6	6	7	
— non germées...	0	4	3	4	4	4	4	2	
Germination très bonne[1]	6	3	0	0	0	0	0	0	
— bonne....[2]	0	0	5	0	4	1	5	0	
— médiocre.[3]	2	3	2	6	2	5	1	7	
			Après 7 jours.						
Graines germées.......	8	7	8	7	7	7	6	7	
— non germées ..	0	3	2	3	3	3	4	2	
Germination très bonne	5	4	3	0	0	0	2	0	
— bonne....	1	1	2	6	2	4	3	0	
— médiocre.	2	2	3	1	5	3	1	7	
Longueur maximum de la tige.	17 c/m	18	13	12	10,5	12	15	7	
			Après 12 jours.						
Graines germées.......	8	7	9	7	8	7	7	9	Les tiges ont atteint depuis longtemps le tampon de coton qui bouche le tube, de sorte qu'il est impossible d'en évaluer la longueur
— non germées ..	0	3	1	3	2	3	3	0	
Germination très bonne	6	6	5	3	2	3	4	0	
— bonne....	2	1	0	0	4	2	2	3	
— médiocre.	0	0	4	4	2	2	1	6	

La présence d'un grand excès de nitrate ou de sulfate d'ammonium n'empêche pas la germination ; mais elle la retarde.

Comme, d'autre part, l'eau distillée et les solutions minérales

1. *Germination très bonne.* — Les tiges ont de 5 à 6 c/m de longueur.
2. — *bonne.* — Les tiges et les racines sont bien sorties.
3. — *médiocre.* — Évolution visible de l'embryon.

de concentration convenable, sont également propices à la germination des graines, il faut en conclure que les espèces de semences que j'ai examinées renferment les substances minérales nécessaires à la germination, ce qui n'a rien que de très naturel, et que la pratique de l'enrobage ne se justifie en aucune façon[1]. L'expérience montre au contraire que les substances les plus indispensables au végétal adulte retardent beaucoup la germination dès qu'elles se rencontrent à dose excessive dans le liquide ambiant.

D'une manière générale l'influence du nitrate de sodium et du sulfate d'ammonium ne se traduit pas par un changement visible dans l'aspect de la plantule ; seules les extrémités des feuilles se dessèchent chez celles qui poussent dans la solution O_5. On remarque également que les racines sont beaucoup moins développées dans les solutions ammoniacales, et qu'à la concentration de 5 pour 1,000 le sulfate d'ammonium produit un effet très net sur l'évolution des plantules sans toutefois arrêter le développement de l'embryon.

Les plantes adultes se comportent d'une façon différente vis-à-vis des solutions renfermant des doses variables de sulfate d'ammonium et de nitrate de sodium.

Si l'on cultive le maïs dans le liquide minéral de la page 30, additionné de 0,5, 1 et 2 pour 1,000 de sulfate d'ammonium, on remarque que les plantes se développent très bien en présence de 0,5 pour 1.000 de ce composé, beaucoup moins bien en présence de 1 pour 1,000. Lorsque la dose atteint 2 pour 1.000, elles meurent généralement très vite ; quelquefois elles évoluent un peu, forment quelques feuilles d'un vert très foncé ; celles-ci possèdent un limbe étroit à parenchyme très épais ; au bout de quelques jours les extrémités se dessèchent, puis la feuille tout entière meurt ; le bourgeon et la tige ne tardent pas à subir le même sort.

J'ai déjà insisté sur les caractères assez frappants que présentent les racines des plantes cultivées dans les solutions ammoniacales. Si on remarque qu'à la dose de 0,5 pour 1,000, ils sont déjà assez prononcés, qu'ils s'accentuent fortement à mesure que la dose de sulfate augmente, et que celle-ci devient

1. Cette conclusion ne vise que les éléments nutritifs et non les substances antiseptiques qui peuvent protéger les graines contre l'invasion des microbes.

rapidement mortelle au delà de 1 pour 1,000, on est en droit de conclure que la réduction des racines est étroitement liée au degré de nocivité de la dose de sel ammoniacal employé. On est conduit également à admettre que la concentration la plus favorable au développement du maïs se trouve au-dessous de 0,5 pour 1,000, dans le voisinage de 0,4 pour 1,000; je n'ai pas essayé cette dose.

Les chiffres des différents tableaux que j'ai donnés page 30 sont d'accord avec cette conclusion; ils ont été fournis par l'analyse de quelques échantillons pris dans des séries de plantes dont l'observation a permis de formuler les conclusions précédentes.

Les nitrates sont mieux supportés. Employés à la dose 0,5, 1 et même 2 pour 1,000, ils fournissent, en plantes sèches, des rendements qui augmentent à peu près dans le même rapport que le temps. Au-dessus de 2 pour 1,000 les plantes poussent encore bien; j'ai fait un essai de culture en présence de 5 pour 1,000 de nitrate de sodium; il n'a pas réussi, les plantes ont péri au bout de quelques jours.

Les racines présentent une surface d'absorption incomparablement plus grande que celles des plantes qui végètent dans des solutions ammoniacales. Cette particularité ne place pas celles-ci dans un état d'infériorité bien marquée vis-à-vis de celles-là; dans les milieux liquides de volume limité, l'aliment vient en quelque sorte au-devant de la plante; mais dans la terre, c'est la plante qui doit aller au devant de l'aliment; la surface d'absorption des racines y devient un facteur important à considérer.

V

CONCLUSIONS

Si l'on résume maintenant les résultats acquis, on peut dire que le maïs assimile également bien l'azote nitrique et l'azote ammoniacal. Le développement des plantes suit une marche parallèle; le poids sec élaboré dans le même temps est à peu près le même, à condition que la concentration du sulfate d'ammonium ne dépasse pas 0,5 pour 1,000.

Dans les solutions minérales qui renferment l'azote sous les deux états, la plante accorde la préférence tantôt à l'azote

ammoniacal, tantôt à l'azote nitrique. Cette faculté élective semble liée à la composition des liqueurs nutritives.

Le poids maximum de plante sèche élaboré par unité de poids d'azote absorbé est à peu près le même, soit que l'on offre de l'ammoniaque à la plante ou qu'on lui donne de l'acide nitrique.

Lorsqu'on alimente le maïs avec du nitrate de sodium, le poids de plante construit augmente à peu près dans le même rapport que le temps, lorsque la concentration du liquide nutritif se maintient au-dessous de 2 pour 1,000 de nitrate.

Avec le sulfate d'ammonium il décroît rapidement à partir de 0.5 pour 1.000 ; la concentration optima se trouve à 0.4 pour 1,000 à peu près; à 2 pour 1.000 les plantes meurent très rapidement.

Pour expliquer l'infériorité de l'ammoniaque sur l'acide nitrique, établie dans la pratique par un nombre considérable d'expériences, il ne reste donc qu'une seule observation : l'influence nocive des sels ammoniacaux à une dose supérieure à 0,5 pour 1,000 et la réduction corrélative des organes souterrains.

Il est évident que si une fumure en apparence très copieuse a pour conséquence de diminuer la surface d'absorption des racines, la plante ne disposera néanmoins que d'une quantité d'aliments nutritifs assez restreinte, puisque le volume de terre explorée diminuera dans le même rapport que la surface de l'appareil radiculaire. On peut donc s'attendre à voir baisser le rendement des récoltes si l'on incorpore à la terre de trop grandes quantités de sels ammoniacaux.

Ces déductions ne sauraient cependant servir, de prime abord, à interpréter les résultats fournis par la pratique. On peut, en effet, se demander si la concentration en sulfate d'ammonium de l'eau retenue par la terre arable, peut, après une fumure, atteindre un degré tel que les plantes en doivent souffrir. Le calcul permet de se faire une idée assez juste de cette concentration. Effectuons ce calcul en nous servant des données de MM. Lawes et Gilbert, p. 27, et supposons en outre que le sulfate se répande dans une couche de terre de 20 centimètres de profondeur, ce qui est une bonne moyenne surtout si le produit est répandu à la surface du sol. Ce cube de terre retient un volume d'eau qu'il faut évaluer ; on peut arriver au résultat assez facilement en admettant que, dans le sol tassé, les parti-

cules se superposent à la façon de petites sphères en laissant entre elles un tiers de vide.

Le tiers du cube de terre considéré peut donc être rempli par l'eau; autrement dit, sur 100 litres de terre, il y a 33 litres d'eau; c'est le cas d'une terre saturée; prenons le cas d'une terre bien ressuyée : admettons qu'elle renferme 30 pour 100 d'eau en volume; nous serons plus près de la réalité. Le volume d'une masse de terre d'un hectare de surface et de 20 centimètres de profondeur est de 2.000 mètres cubes; le volume d'eau évalué à 30 pour 100 est donc de 600 mètres cubes.

Si la dose de sulfate d'ammonium introduite dans ce volume d'eau est de 226 kilogrammes (quantité correspondant à 48 kilogrammes d'azote) la concentration est représentée par $0^{gr},376$ par litre.

Pour une dose de	96 kgr.	elle est de	0,752
—	144	—	1,128

Je dois ajouter que le pouvoir absorbant du sol immobilise une certaine fraction de cette quantité d'ammoniaque; mais il faut remarquer que les racines ne sont pas sans action sur cette ammoniaque faiblement retenue, et tout se passe à peu près comme si elle était complètement libre ; il faut remarquer, d'autre part, que l'évaporation tend continuellement à augmenter la richesse de la solution, si bien que l'on peut dire que ces chiffres ne sont pas certainement supérieurs aux chiffres réels.

Ceci étant établi, il est facile de comprendre, à la suite des résultats que j'ai obtenus avec les solutions minérales, que les chiffres 0,752 et 1,128 qui expriment la concentration de l'eau d'imbibition de la terre en sulfate d'ammonium, doivent correspondre à un retard dans le développement de la plante, et à un abaissement dans le rendement des récoltes.

Pour vérifier si ces déductions sont corroborées par les résultats obtenus par MM. Lawes et Gilbert, il suffit de se reporter au tableau de la page 27. On y verra : 1° que les rendements ne varient pas dans le même rapport que les doses d'azote fournies au sol; 2° que l'augmentation de rendement est plus élevée entre les limites 0 et 48 kilogrammes d'azote qu'entre les limites 48 et 96, plus élevée entre ces dernières qu'entre les deux suivantes.

Les nitrates produisent un effet tout à fait différent.

On peut aller plus loin encore dans la voie de l'identification des résultats théoriques et pratiques. Puisque les engrais ammoniacaux demandent à être employés à dose modérée. toutes les causes qui contribuent à diluer les solutions du sol favoriseront par là même le développement des plantes. Les terres fortes retiennent plus d'eau que les sols légers ; les premières fourniront donc de meilleures récoltes que les secondes pour une même quantité de sulfate d'ammonium, répandue à l'hectare. Ces conclusions sont confirmées par les observations de M. Dehérain.

Une saison pluvieuse doit favoriser l'action des sels ammoniacaux : une saison sèche exaltera au contraire leur influence nocive. L'expérience prouve encore qu'il en est ainsi : voici les rendements en grains obtenus à l'hectare dans des cultures de blé faites à Rothamsted en 1882, année pluvieuse. et en 1887, année très sèche.

	1882 Hectolitres	1887 Hectolitres
Nitrate et engrais minéraux...	29,34	36.30
Sels ammoniacaux — ...	31,68	26,83
Nitrates quantité double	32,24	39,46
Sels ammoniacaux —	39,23	32,92

On peut joindre à ces chiffres ceux qui ont été donnés par MM. Lawes et Gilbert pour l'année 1870, année très sèche également.

Années	Sans Engrais	Engrais minéraux + 448 kgr. Sels ammon.	Engrais minéraux + 600 kgr. nitrates.	Pluie recueillie en Avril, Mai, Juin
1870	725 kgr.	3625 kgr.	7000 kgr.	7 m/m 65
Moyenne des 15 années précédentes.	1771	6527	7350	16,25

Les rendements en orge et avoine offrent les mêmes variations.

L'influence de la sécheresse ou de l'humidité sur l'action des sels ammoniacaux ne doit pas tenir seulement au degré de concentration. La marche de la nitrification intervient également et on doit en tenir compte : l'humidité favorise la transformation de l'ammoniaque en acide nitrique. Dans les saisons pluvieuses, l'influence nocive des composés ammoniacaux s'atténue donc d'abord par leur dilution et ensuite par leur transformation en nitrates. Cette observation nous conduit à nous demander quelle est la quantité d'ammoniaque nitrifiée dans la terre arable pendant les divers mois de l'année.

M. Dehérain a effectué ces recherches dans les conditions suivantes : Il place 50 kilogrammes de terre additionnés de 12 grammes de sulfate d'ammonium dans un grand vase ; à côté un vase témoin renferme le même poids de terre, non additionné de sel ammoniacal.

Les eaux de drainage ont été recueillies à des époques différentes, et on y a dosé les nitrates. Voici les résultats obtenus :

	Eaux de drainage.		Azote nitrique recueilli.	
	Témoin. c.c.	Terre avec du sulfate. c.c.	Témoin. mgr.	Terre avec sulfate d'ammo. mgr.
6 au 24 Janvier 1890....	2900	1910	52	112
24 Janvier au 3 Février.	1840	3150	27	178
3 Février au 5 Mai	1960	1950	68	129
4 Mai au 31 Mai........	3330	2680	124	153
3 Juin au 15 Juillet.....	7850	6820	375	2039
	17.880	16.510	646	2.611

L'expérience avait été commencée au mois de novembre 1889; les quantités d'ammoniaque nitrifiées pendant l'hiver et le printemps sont peu abondantes, comme l'on voit: la nitrification ne devient véritablement active que vers le mois de juin; néanmoins, tout l'azote nitrique correspondant à l'ammoniaque distribuée n'a pas été retrouvé au mois de février 1891. Les sels ammoniacaux conservent donc en partie leur état primitif pendant plus d'une année dans la terre. Le sulfate répandu en automne ou au commencement du printemps à une dose supérieure à 226 kilogrammes à l'hectare exerce donc son influence retardatrice sur le développement des plantes au moins jusqu'au mois de juin. A cette époque, les céréales sont déjà bien avancées; leurs organes souterrains ont atteint à peu de chose près le maximum de surface ; s'ils ont subi un retard dans leur évolution, le poids des récoltes s'en ressentira, car la maturation débutera quelques jours plus tard, et ne laissera pas à la plante le temps de combler le déficit.

En un mot, tout concorde à établir que l'infériorité des sels ammoniacaux tient à l'influence nocive qu'ils exercent sur les plantes à dose élevée; les nitrates ne produisent rien de semblable dans les limites assignées par les exigences des cultures en azote. L'ammoniaque n'en constitue pas moins un aliment azoté aussi efficace que les nitrates ; mais il faut savoir l'employer.

INSTITUT ANTIRABIQUE DE JASSY

UN CAS DE PSEUDO-RAGE

CHEZ UN MALADE ATTEINT DE LA MALARIA

Par le Dr J. LEBELL

Le cas qui suit est doublement intéressant, par sa rareté et par sa cause occasionnelle.

Eftim Obreja, âgé de 16 ans, originaire de Vaslui (Moldavie), domestique, ne présentant rien d'anormal, ni dans ses antécédents héréditaires, ni dans les siens propres, avait pourtant un sommeil agité et un peu de somnambulisme. Il avait également coutume de dormir avec le chat de la maison. Une nuit, il remarqua quelque inquiétude chez l'animal, crut apercevoir de la bave lui coulant de la gueule, et il lui sembla que sa main en avait été souillée. Le lendemain matin, le chat, jusqu'alors doux et inoffensif, devint agressif, se jeta sur les gens de la maison pour les mordre, de même que sur le patient, et, comme on le chassait, il se précipita sur les chiens et les volailles de la basse-cour. Notre sujet, effrayé, abattit le chat le jour même. Sept jours plus tard, le 26 juin, il se plaint de vertiges, de difficulté de respirer et d'avaler des liquides, plaintes dont son patron n'eut aucun souci.

Cependant les symptômes s'accentuent de plus en plus, tant et si bien que le maître fut forcé de nous amener son domestique en consultation.

Le patient, de constitution débile, a les traits tirés et manifestant des signes de frayeur; les téguments sont pâles avec coloration subictérique des conjonctives; il est agité, il accuse des vertiges, de la difficulté à avaler et à respirer. Il garde dans sa bouche l'eau qu'on lui présente sans l'avaler, et subit en même temps un spasme de déglutition; une insufflation d'air sur

le nez et sur la bouche lui donne un spasme respiratoire.

Température axillaire 39°5, pouls 124, petit et faible : la rate hypertrophique, 4 doigts sous les fausses côtes. Le patient nous dit qu'il souffre de la fièvre à dater du jour où se sont manifestés les symptômes annoncés plus haut. La fièvre se présente sous forme quotidienne vers le soir et se termine par des sueurs abondantes.

Tout d'abord le patient m'a paru présenter des symptômes rabiques pathognomiques résultant de l'infection par la bave de l'animal enragé ; car le chat, d'après les symptômes présentés pendant la vie, était, selon toutes les probabilités, atteint de la rage et, le patient dormant avec lui lorsqu'il était déjà agité et qu'il bavait, a pu aisément être infecté sans même avoir été mordu, fait qui se présente, quoique rarement. Cependant voici les circonstances qui m'ont amené à exclure toute idée d'une infection rabique : la durée de l'incubation de sept jours, telle qu'elle résulte de l'anamnèse, quoique possible, se présente très rarement dans les statistiques, et encore, seulement, dans les cas de morsures très graves à la figure et à la tête ; de plus la persistance de l'hydrophobie et de l'aérophobie, seize jours après leur manifestation, est un fait qui plaide d'une façon à peu près certaine contre la supposition d'une infection rabique, car la durée maximum de la rage déclarée, enregistrée jusqu'à présent par la science, n'a jamais dépassé sept jours [1].

En outre, tandis que dans la rage vraie, le bruit ou l'idée de l'eau suffisent à produire le spasme de déglutition, notre patient pouvait garder l'eau dans la bouche, sans manifester le moindre mouvement spasmodique s'il ne se forçait pas d'avaler cette eau.

En second lieu, l'aérophobie de notre patient se présente également sous une forme particulière. On sait, en effet, que dans la rage une simple insufflation d'air sur la peau suffit pour déterminer le spasme respiratoire (le symptôme cutané), tandis que chez notre patient le spasme ne se manifeste que lorsque l'insufflation de l'air a lieu directement dans la bouche ou dans le nez.

En vertu de ces observations et en excluant la rage, j'ai pensé avoir affaire à une pseudo-rage à base suggestive, occasionnée

1. *Specielle Pathologie u. Therapie v. Hofr. Prof. Nothnagel, Zimmsen, IIe Abth.* Lyssa v. Prof. Dr Högyes,

peut-être par des accès fébriles chez notre malade, atteint de malaria comme je l'ai vu.

La crainte d'infection rabique qui l'a saisi lorsqu'il a eu sous les yeux le chat enragé, avec lequel il avait dormi, crainte fortifiée par les discussions auxquelles elle avait donné lieu, et par les récits des symptômes de la rage (hydro et aérophobie) qu'on lui fit, ainsi que nous l'affirme son maître, l'ont prédisposé à l'auto-suggestion. Cette suggestion a été fouettée ensuite par des accès fébriles suivis de leurs manifestations, telles que céphalalgie, agitation, insomnie, vertiges, etc.

Il ne pouvait être en aucun cas question d'un traitement antirabique, car, ou bien la rage était déclarée, et dans ce cas tout traitement est superflu, ou bien il s'agissait d'une rage suggérée, et alors un traitement antirabique était inutile.

Le traitement antimalarique et psychique employé par moi a pleinement réussi, et a justifié mon diagnostic de pseudo-rage par autosuggestion (lyssophobie), occasionnée par des accès de malaria. Le 9 août, jour de son entrée à l'Institut, j'ai administré au patient une dose de quinine et de bromure de potassium, et en même temps je lui ai fait deux injections avec de l'eau stérilisée, faites aux heures habituelles d'inoculation des autres malades de l'Institut.

Le lendemain, 10 août, le malade affirma qu'il respirait mieux et qu'il avalait l'eau encore plus facilement : état fébrile disparu, pouls moins agité, éruption d'un herpès labial. Le matin du 11 août on répète exactement le traitement ci-dessus. Nous le gardons encore trois jours en observation à l'Institut, au bout desquels nous le renvoyons complètement guéri.

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

13me ANNÉE FÉVRIER 1900 N° 2

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

SUR LE MODE D'ACTION DE CERTAINS POISONS RÉNAUX

Par le Dr W. LINDEMANN

Assistant de l'Institut de Pathologie générale de l'Université de Moscou.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Quoique les lésions anatomiques provoquées par les poisons rénaux aient été assez bien étudiées, le mode d'action de ces toxines reste encore tout à fait énigmatique.

Les lésions anatomiques sont au plus haut degré uniformes: ce n'est que très difficilement que l'on parvient à établir certains groupes, et ceci en se basant non sur la présence exclusive, mais seulement sur la prépondérance de tel ou tel symptôme anatomique.

Ainsi il est possible de ranger dans un groupe naturel tous les poisons qui provoquent la glomérulo-néphrite comme lésion essentielle, ce qui est le cas par exemple pour la cantharidine, l'acide méséréique et les autres poisons provoquant des inflammations locales au lieu de l'inoculation.

Au point de vue de l'action sur les reins, c'est à ce groupe qu'appartient aussi le virus scarlatineux.

Comme appartenant à un autre groupe, on peut citer les sels métalliques et les oxydes des métaux lourds, qui provoquent avant tout une nécrose coagulante des tubes contournés. Le représentant le plus typique de ces poisons est l'acide chromique.

Le troisième groupe est caractérisé par la vacuolisation et la destruction rapide des cellules épithéliales, dont les noyaux peuvent conserver leur aspect normal pendant un temps assez

long, ce qui différencie assez nettement ce groupe du groupe précédent, qui est caractérisé par la rapide et profonde destruction des noyaux.

Dans des stades ultérieurs, aux lésions cellulaires vient s'ajouter la formation d'une grande quantité de cylindres.

Ces lésions rénales sont engendrées par des toxines animales ou végétales comme le venin des serpents, le sérum d'anguilles, l'abrine et la ricine.

Mais entre ces différents groupes il y a de nombreuses transitions, et il est même possible de provoquer des lésions anatomiques plus ou moins intermédiaires en modifiant les doses, les espèces animales et le mode d'administration du poison. C'est pour cela que tant que le mode d'action de ces poisons nous sera inconnu, toute tentative de classification doit être considérée comme prématurée et tout fait nouveau peut présenter une certaine valeur.

C'est pourquoi j'ai accepté avec empressement la proposition de M. Metchnikoff de faire des recherches sur l'action de la *vinylamine*, qu'il m'a donnée, et qui lui a été envoyée par M. le professeur Ehrlich.

Cette substance présentait d'autant plus d'intérêt, qu'en se fondant sur les données de M. le professeur Ehrlich [1], on pouvait s'attendre à obtenir une évolution rapide des altérations cirrhotiques, lesquelles constituent le stade consécutif de toutes les néphrites toxiques ne se terminant pas par la mort pendant la période d'intoxication aiguë.

La vinylamine $CH^2{=}CH{-}AzH^2$ est l'amine primaire de l'alcool vinylique. C'est M. Gabriel [2] qui l'a préparée pour la première fois en faisant agir de l'hydroxyde d'amine ou de la potasse sur le bromhydrate de bibrométhylamine $CH^2 Br. CH^2. AzH^2 HBr$.

$$CH^2Br. CH^2. AzH^2BrH + 2KOH = CH^2 : CH. AzH^2 + 2KBr + 2H^2O$$

A l'état pur c'est un liquide de couleur jaunâtre, d'une odeur pénétrante assez caractéristique, d'une réaction fortement alcaline. Le point d'ébullition est 55-56° C. L'action

1. *Munch. Med. Woch.*, 1898.
2. *Ber. chem. Ges.*, 28.

toxique de ce corps a été constatée par M. le professeur Ehrlich, qui a signalé chez les animaux la nécrose papillaire et le développement de tissu conjonctif dans les reins.

Pour mes expériences, je me suis servi d'une préparation, qui provenait du laboratoire de M. le professeur Gabriel lui-même, et qui était conservée en glacière dans des tubes scellés.

La base libre, après dissolution dans l'eau, était titrée par une solution déci-normale d'acide chlorhydrique, le méthyl-orange servant d'indicateur. La solution originaire était neutralisée par la quantité voulue d'acide, et additionnée d'eau jusqu'à la concentration de 0,5—1,0 0/0 de base libre.

C'est cette solution qui était introduite sous la peau des animaux. L'injection du chlorhydrate ne provoquait aucune réaction locale : celle de la base libre était suivie par un œdème et une inflammation assez accentuée.

Mes expériences ont été les suivantes :

1). Empoisonnement aigu de 28 souris et de 2 lapins par des doses différentes d'une solution fraîchement préparée.

2). Empoisonnement chronique de 2 chiens et 3 lapins par des injections quotidiennes d'une solution préparée d'avance. J'ai trouvé que si la solution fraîchement préparée est aussitôt mise dans des tubes scellés et est gardée au froid, à l'abri de la lumière, elle se conserve pendant un temps assez long, après avoir été rigoureusement neutralisée. Le commencement de la décomposition est indiqué par l'apparition d'un précipité lorsqu'on y ajoute de l'acide picrique, cette réaction ne devant pas avoir lieu dans des solutions fraîches.

A l'air et à la température de laboratoire, la décomposition s'observe déjà après quelques heures.

Mais en présence de l'observation de M. le professeur Ehrlich, qui a constaté une très grande instabilité de la vinylamine, je ne me suis servi de ces solutions conservées que dans les expériences sur l'empoisonnement chronique, qui n'étaient pas possibles autrement, à cause de la très petite quantité de poison que j'avais à ma disposition.

3). Enfin pour étudier l'action de la base libre, laquelle, par analogie avec l'ammoniaque, pouvait présenter des propriétés toxiques plus énergiques que le chlorhydrate, j'ai fait encore trois expériences sur les lapins en leur injectant, dans la veine

auriculaire, de la base libre en solution aqueuse, dont la concentration était déterminée par titrage. L'action sur les reins était tout à fait identique à celle provoquée par le chlorhydrate.

En injectant, sous la peau des souris, des doses considérables (0,5-1,0 mg. à un animal de 15 gr.) on observe, une demi-heure après, un tremblement qui fait bientôt place à des convulsions cloniques se répétant sous forme d'accès pendant 2 à 3 heures, après quoi les convulsions sont suivies par une parésie progressive. L'animal est couché sur le flanc, les extrémités allongées : il respire bien faiblement. Enfin la respiration s'affaiblit d'avantage et l'animal meurt.

Dans les cas d'empoisonnement aigu, les souris meurent en 5-10 heures après l'injection : mais j'ai pu aussi observer des cas où, après l'injection des mêmes doses, les altérations respiratoires et la parésie rétrogradaient peu à peu, l'animal se rétablissait et ne succombait que quatre à cinq jours après, après avoir présenté des symptômes d'une néphrite aiguë.

Dans les cas où l'empoisonnement était déterminé par des doses moyennes ou petites, les symptômes de l'empoisonnement aigu n'avaient pas lieu du tout, ou se présentaient sous forme de tremblements et une sensibilité exagérée des réflexes.

Les symptômes néphritiques ne diffèrent guère de ceux qui sont provoqués par n'importe quel autre poison rénal, comme par exemple l'aloïne ou les sels chromiques.

Parmi les altérations fonctionnelles des reins, il faut mentionner avant tout une albuminurie très accentuée, qui s'observe même après l'empoisonnement par des doses très petites pendant le premier jour.

Le lendemain, on trouve dans le dépôt urinaire une quantité considérable de cylindres granuleux, de leucocytes et de noyaux cellulaires libres, entourés seulement de quelques débris du protoplasma. Les hématies ne se trouvent qu'en petite quantité et dans quelques cas seulement.

La quantité d'urine est augmentée : elle est très diluée et claire. Dans les derniers stades de l'empoisonnement, la quantité d'urine baisse de nouveau, et la mort est d'ordinaire précédée par une anurie complète. La réaction de l'urine ne change pas d'une manière appréciable, et reste acide chez les chiens, légèrement alcaline chez les lapins.

Il nous semble être de grand intérêt également de noter l'action très accentuée de la vinylamine sur la nutrition générale. Les animaux soumis à l'empoisonnement chronique maigrissent beaucoup plus vite que ne le font les animaux pendant l'inanition complète.

Ainsi un lapin, empoisonné par des injections quotidiennes de 0.0025 de vinylamine, a perdu en 4 jours 24,6 0/0 de son poids initial; un autre lapin a perdu dans les mêmes conditions en 6 jours 50,5 0/0 ; un troisième en 23 jours 41,3 0/0.

Tous ces animaux se nourrissaient bien, et à l'autopsie leur estomac et l'intestin étaient trouvés remplis de masses alimentaires d'aspect normal. Dans l'inanition, la mort survient chez les chiens après la perte de 40-45 0/0 du poids initial : chez les animaux de petite taille, les lapins, par exemple, elle est d'ordinaire beaucoup plus précoce. Un amaigrissement aussi prononcé ne se produit d'ailleurs qu'après un laps de temps plus long qu'à la suite de l'empoisonnement par la vinylamine.

Cela prouve que la vinylamine, outre son action sur le système nerveux et les reins, peut aussi provoquer certaines altérations au point de vue des échanges nutritifs, en agissant sur l'économie comme le font le phosphore, l'arsenic, la pulégone, récemment étudiée par moi. Mais entre l'action de la vinylamine et celle des poisons qui viennent d'être nommés, il y a une différence essentielle, c'est que la dégénérescence graisseuse, qui est le trait le plus caractéristique de ces empoisonnements, n'atteint jamais ce degré après l'injection de la vinylamine.

Les lésions macroscopiques, provoquées par la vinylamine, que l'on peut observer à l'autopsie, sont très peu accentuées. Après l'empoisonnement aigu, on trouve une hyperémie assez forte de tous les organes de la cavité abdominale, et des lésions parenchymateuses du foie et des reins. Si la survie est un peu plus longue, on trouve quelquefois la substance médullaire du rein semée de taches cunéiformes d'une couleur plus pâle, que l'on peut prendre à l'examen macroscopique pour une nécrose papillaire. Mais l'examen histologique montre qu'il s'agit seulement d'une anémie locale, provoquée probablement par la compression de quelques vaisseaux sanguins de la couche intermédiaire par les débris cellulaires qui s'accumulent en grande quantité en ce point.

Dans le cours de l'empoisonnement chronique, à ces lésions s'adjoint un amaigrissement, avec des résidus considérables de graisse dans l'épiploon et dans le tissu sous-cutané, et une dégénérescence graisseuse des organes parenchymateux, ce qui rend la lésion plus frappante chez les chiens.

Les lésions microscopiques varient selon la durée de l'empoisonnement. Chez les animaux qui n'ont survécu à l'empoisonnement que quelques heures, tout le rein se présente hyperémié, les glomérules sont bourrés d'hématies et sont augmentés de volume. Dans la plupart des capsules de Bowman se trouvent des cellules épithéliales et de l'albumine sous forme de masses spumeuses. Dans les tubes contournés, les noyaux des épithéliums ne présentent aucune altération, mais le protoplasma est gonflé et semble être plus diaphane que dans les cellules normales. La lumière des canalicules disparaît dans la plupart des cas. Beaucoup de canalicules présentent aussi des lésions d'un aspect tout à fait caractéristique, qui ressemblent bien à celles qui ont été décrites par M. Novak [1] au cours de l'intoxication par le venin des scorpions et des serpents, et par M. Petit [2] à la suite de l'empoisonnement par le sérum d'anguille.

Dans ces cellules, le protoplasma est très diaphane et vacuolisé. La structure normale de l'épithélium a tout à fait disparu, et la cellule semble remplie de vacuoles d'une forme irrégulière et de différentes dimensions.

Dans les cas où ce processus est plus accentué, ce qui arrive si la survie est assez longue, le noyau semble être situé au milieu d'un réseau de trabécules irrégulières qui passent sans interruption dans un réseau semblable formé par la cellule voisine. Dans beaucoup de canalicules, on ne retrouve plus de noyaux et il ne reste que des débris d'un pareil réseau. Ce processus donne l'impression que le protoplasma subit une dilution progressive, et que les masses fluidifiées sont entraînées par le courant d'urine.

Cette interprétation est basée sur le fait de la présence de débris cellulaires avec des noyaux bien conservés dans les canalicules droits de la couche intermédiaire, et dans le dépôt urinaire des animaux empoisonnés. Les cellules des anses de

1. *Ann. Inst. Past.*, 1898.
2. *C. R. Soc. Biol.*, 1898.

Henle et de la substance médullaire ne présentent aucune altération.

Si la durée de l'empoisonnement est encore plus grande, on trouve que la glomérulo-néphrite est augmentée d'intensité, et que les canalicules sont remplis d'une masse granuleuse. Les noyaux, qui ne présentaient presque aucune lésion dans les cas d'empoisonnement aigu, sont diminués de volume, présentent des contours irréguliers et se colorent avec une extrême intensité par toutes les couleurs de la chromatine (pyknose du noyau). Les masses de détritus cellulaires, mélangées à des cellules contractées avec des noyaux pyknotiques, sont chassées par le courant de l'urine, qui est encore sécrétée par les glomérules, dans la couche intermédiaire où ils forment de grands amas pouvant comprimer les vaisseaux sanguins, comme j'en ai fait déjà mention plus haut. Les cellules des tubes droits ne présentent aucune lésion aussi dans ces cas.

Enfin dans les cas où les animaux survivent à l'empoisonnement pendant 10 ou 20 jours, on observe que la glomérulo-néphrite diminue, mais dans les canalicules contournés les noyaux disparaissent dans un nombre de cellules de plus en plus grand, et c'est la formation des cylindres qui est le trait prédominant dans le tableau microscopique de ces lésions. Les cylindres présentent dans ces cas un aspect cireux. Ces masses hyalines remplissent la lumière non seulement des canalicules droits, mais encore celles des canalicules contournés, et se trouvent en plus grande quantité que dans toute autre intoxication rénale.

Le tissu interstitiel reste sans altérations ; on n'observe pas non plus d'amas leucocytaires autour des lésions rénales. Cette faible réaction des tissus mésodermiques dans le cours de l'empoisonnement par la vinylamine peut expliquer probablement le fait que, même dans des cas d'empoisonnement chronique, il ne survient pas de processus de cirrhose secondaire, qui est typique pour la plupart des poisons rénaux.

Ainsi, vu les altérations provoquées par la vinylamine, on pourrait classer celle-ci dans le groupe des poisons auxquels appartiennent les toxines bactériennes, et les venins animaux et végétaux, de composition inconnue, dont le mode d'action est le plus énigmatique de tous les poisons. En plus la présence de la

glomérulo-néphrite si accentuée dans les premiers stades du processus, la rapproche du groupe de la cantharidine.

Il serait d'un certain intérêt de poursuivre plus profondément l'action toxique, en particulier en vue de l'action néphritique de tout le groupe des substitués ammoniacaux. Pour ne citer que des faits déjà connus, je peux signaler entre autres que les lésions néphritiques sont aussi provoquées par les diamines (cadavérine, putrescine) et par l'ammoniaque elle-même. La dégénérescence vacuolaire est aussi provoquée par le tétraéthylphosphonium. Étant donné le fait que beaucoup de ces substances se trouvent parmi les produits de la plupart des bactéries intestinales, comme, par exemple, le choléra et le bacille du colon, une pareille recherche pourrait élucider sur quelques points la pathogénie des néphrites qui compliquent quelquefois les infections intestinales aiguës. La vinylamine présente ainsi seulement un nouveau représentant d'un groupe déjà connu des poisons rénaux, et ne peut guère changer nos idées sur le mode d'action de ces poisons.

Mais à côté de ces poisons d'une constitution chimique bien connue et parfois bien simple, l'attention des pathologistes a été attirée dans ces derniers temps par un nouveau groupe de composition très compliquée, auquel appartiennent avant tout les toxines et les venins déjà mentionnés, et outre cela aussi les sérums de différents animaux.

Un grand nombre de ces poisons, qui constituent dans bien des cas des produits de l'organisme animal, se présentaient comme des poisons rénaux d'une force extrême, provoquant de l'albuminurie à des doses infinitésimales. Mais, si même pour expliquer l'action des poisons semblables à l'acide chromique, par exemple, qui tue un lapin à la dose de 0,05 gr. par destruction totale du rein, on ne peut pas admettre que toute la masse du détritus cellulaire représente une combinaison chimique du poison introduit avec les substances albuminoïdes du protoplasma cellulaire, parce que, de la faible quantité du poison introduit, la plus grande partie abandonne l'organisme bien vite après l'introduction, il est au plus haut degré invraisemblable qu'une pareille combinaison puisse se produire avec les poisons de ce groupe.

C'est pour cela que l'étude de ces poisons présente un intérêt

non seulement au point de vue casuistique, mais encore comme pouvant contribuer à l'explication du mode d'action de tous les poisons rénaux.

C'est Claude Bernard qui a trouvé que le sérum sanguin injecté dans les veines d'un animal appartenant à une autre espèce peut donner lieu à une albuminurie plus ou moins durable. Il avait injecté du sérum de chien à des lapins. Ces faits ont été confirmés par beaucoup d'autres observateurs, et récemment Weiss[1] a trouvé que tout sérum appartenant à une espèce étrangère provoque une albuminurie chez le lapin, et que même le sérum d'un animal appartenant à un autre sexe peut produire le même effet.

Il a trouvé que les sérums les plus toxiques sont ceux de chat et de cobaye : l'injection de ces sérums est même mortelle. Dans tous les cas, la quantité de l'albumine sécrétée est toujours inférieure à celle que contenait le sérum injecté.

Mais le sérum normal, même provenant d'une autre espèce animale, semble agir comme un poison rénal seulement dans des cas exceptionnels, et en particulier c'est aussi le cas pour le sérum du cobaye envers le lapin.

En injectant des doses assez grandes (jusqu'à 8 c. c. p. kg.) je n'ai pas observé dans la plupart des cas même de l'albuminurie, ce qui confirme bien les faits signalés par d'autres auteurs.

Alors, pour pouvoir faire des études sur ces poisons du sérum, il a fallu ou prendre des sérums d'une toxicité naturelle plus accentuée, ou chercher à augmenter la toxicité d'un sérum qui était inoffensif auparavant.

En suivant le conseil de M. Metchnikoff, j'ai essayé de m'approcher de la solution de cette question par une méthode qui a déjà donné de si beaux résultats à M. Bordet et à M. Metchnikoff[2] lui-même, c'est-à-dire d'essayer d'augmenter la toxicité du sérum envers les reins par l'introduction de la substance rénale dans l'organisme. En effet, après avoir reçu chaque semaine des injections d'une émulsion de reins de lapin, les cobayes ont fourni un sérum qui était d'une toxicité extrême pour ce dernier animal. Il provoquait, à des doses assez petites (1,25-2,6 c. c. p. kg.), non seulement une albumi-

1. *Pflügers Arch.*, 65, Bd.

2. *Ann. Inst. Past.*, 1899.

nurie considérable, mais même la mort par l'urémie le 3me et 5me jour après l'injection intraveineuse.

Les témoins qui recevaient le sérum de cobayes normaux ne présentaient aucun symptôme morbide, et c'est seulement dans un cas (sur 3) que j'ai vu apparaître une albuminurie passagère après l'injection de 12 c. c. de sérum. Je n'ai jamais vu aucune action générale si minime qu'elle soit. L'expérience suivante peut en servir de preuve. Un lapin qui a reçu 8 c. c. de sérum normal ne présentait aucun symptôme morbide pendant 7 jours ; après cela il a reçu 8 c. c. de sérum de l'animal préparé par l'injection de la substance rénale. Cette dernière injection a provoqué une albuminurie déjà quelques heures après, et en 2 jours il s'est produit une anurie complète qui a amené la mort de l'animal 24 heures après.

Les reins des animaux tués par les injections de ce sérum présentent des lésions histologiques qui ressemblent beaucoup à celles que l'on trouve après l'empoisonnement par les poisons rénaux. Ces lésions consistent principalement dans une nécrotisation et désintégration profonde de l'épithélium des canalicules contournés. La plupart des canalicules sont transformés en amas d'une masse granuleuse, dans laquelle on peut trouver quelques noyaux pyknotiques ou des débris de chromatine sous forme de granules ronds. Les noyaux qui persistent encore ne présentent jamais les phénomènes de chromatolyse et de gonflement, qui sont si caractéristiques pour la nécrose coagulante provoquée par des sels métalliques, et il semble qu'ici, comme dans l'empoisonnement par la vinylamine, les altérations du protoplasma précèdent celles du noyau. Les glomérules ne présentent aucune altération spécifique. Dans quelques-unes on trouve des amas d'albumine.

Dans les tubes droits de la couche intermédiaire et de la substance médullaire, on trouve de nombreux cylindres granuleux.

Ainsi l'injection de ce sérum, que l'on pourrait nommer, par analogie avec le sérum hémolytique, le sérum néphrolytique, provoque des altérations qui sont tout à fait analogues à celles qui sont provoquées par de vrais poisons rénaux.

Quel pourrait être le principe actif de ce sérum ? L'interprétation la plus probable est la suivante :

Par analogie avec d'autres agents de ce genre, on pourrait admettre ici la formation de certaines substances spécifiques, qui se forment dans le sang sous l'influence des processus de résorption de la substance rénale injectée, et ce sont ces substances qui altèrent le rein.

J'espère pouvoir prochainement élucider cette question intéressante, surtout étant donné l'intérêt essentiel que présentent maintenant les diastases et les autres substances spécifiques du sang pour la pathogénie des nombreux processus morbides.

En terminant mon petit travail, je saisis avec plaisir l'occasion de remercier bien sincèrement M. Metchnikoff pour m'avoir posé un problème si intéressant et pour le grand intérêt avec lequel il a suivi mon travail.

EXPLICATION DE LA PLANCHE I

Fig. 1. — Rein d'une souris empoisonnée par la vinylamine. Hyperémie des glomérules, et dépôt d'albumine dans la capsule de Bowman.

Fig. 2. — Rein d'un lapin à un stade plus avancé : formation des cylindres.

Fig. 3. — Action du sérum néphrolytique : désagrégation des cellules épithéliales de la substance corticale du rein d'un lapin.

Fig. 4. — Action du sérum néphrolytique : pyknose des noyaux ; formation des cylindres aux dépens du détritus cellulaire dans le rein d'un lapin.

LA PROTÉOLYSE CHEZ L'ASPERGILLUS NIGER

PAR LE Dr G. MALFITANO

PREMIER MÉMOIRE

Travail du laboratoire de M. Duclaux.

Les phénomènes protoplasmiques d'une cellule quelconque, végétale ou animale, comportent un double mouvement d'assimilation et désassimilation, de construction et de destruction, qu'on a surtout étudié sur les substances ternaires, et qu'on a pu attribuer dans quelques cas à des diastases assez bien définies. La mise en œuvre des matériaux alimentaires puisés dans le milieu ou emmagasinés à titre de réserve, d'une part, de l'autre, l'élimination des parties usées de la cellule, exigent un travail préalable de solubilisation. Il y a d'abord des modifications de l'ordre physique portant sur le degré de cohésion, et aussi des désintégrations moléculaires qui réduisent ces matières en groupements plus simples et plus appropriés au transport. Les phénomènes de cet ordre sont physiologiques au premier chef : nous avons le droit de croire qu'ils s'appliquent aux matières albuminoïdes comme aux corps ternaires, et que la mise en œuvre physiologique des composés protéiques, tant pour l'assimilation que pour la désassimilation, est produite par des diastases. On désigne sous le nom de *protéolyse* l'ensemble des processus de solubilisation et de désintégration des matières protéiques, sans rien préjuger du mécanisme intime ni de la signification des modifications produites, et nous appellerons diastase protéolytique celle que Bitter a trouvée dans les organismes qui liquéfient la gélatine.

J'ai pensé à étudier sur cette diastase quelques-uns des problèmes encore pendants au sujet des diastases des matières albuminoïdes. Je me suis adressé pour cela à l'*aspergillus niger*, que nous savons cultiver sur des milieux exempts de matières albuminoïdes, et duquel on a déjà tiré tant de résultats intéressants.

Voyons comment nous pouvons mettre en évidence, dans le milieu de culture d'abord et dans le mycélium ensuite, la présence d'une diastase dissolvant la gélatine, et comment nous pourrons juger de sa quantité.

I

ÉTUDE DE LA DIASTASE DANS LE MILIEU

On ne sait pas bien comment agit la diastase qui liquéfie la gélatine. Mais il n'est pas nécessaire de le savoir pour en faire l'étude. Il suffit que l'effet qu'elle produit soit facilement appréciable, et qu'on puisse juger en gros de la puissance de la diastase par le temps qu'elle met à liquéfier une certaine quantité de gélatine à laquelle elle est mélangée, ou par la quantité de gélatine qu'elle peut liquéfier pendant le même temps.

1° *Dosage du pouvoir protéolytique du milieu de culture.* — Dans un tube à essais qui contient 5 centimètres cubes de gélatine au thymol, fondue à basse température, on ajoute 10 c. c. de liquide provenant d'une culture déja mûre d'*aspergillus*, sur milieu Raulin ; on mélange bien le contenu, et on porte le tube à l'étuve à 35°. Après 12-20 heures la gélatine ne se solidifie plus quand on la refroidit jusqu'à 15°. Ce phénomène est dû à l'action d'une diastase, parce que dans un tube pareil, dans les mêmes conditions, la gélatine ne perd pas sa propriété de se reprendre en gelée, si on a chauffé pendant quelques minutes à 100° le liquide de culture avant de l'ajouter. Pour introduire des mesures dans l'observation de ce phénomène, nous opérerons donc de la façon suivante :

On prépare une certaine quantité de tubes à essais, dans lesquels on verse 5 c. c. d'une solution de gélatine à 20 0/0, additionnée de thymol cristallisé dans la proportion de 2 grammes par litre. On mélange à la gélatine fondue à basse température le liquide diastasique ramené toujours au même volume et à la même réaction, car nous verrons plus tard que la réaction acide

ou alcaline a de l'influence. Les tubes ainsi préparés sont portés à l'étuve à 35°. A des intervalles de temps déterminés, on les retire et on les refroidit dans un bain d'eau jusqu'à la température de 15°, marquée par un thermomètre plongé dans un de ces tubes. On considère l'action comme terminée lorsque la gélatine à cette température reste liquide en permanence. Le pouvoir protéolytique est d'autant plus *faible* que le nombre d'heures nécessaire pour amener le mélange à cet état est plus grand.

Il est nécessaire, dans une série d'expériences comparatives, que la gélatine provienne de la même préparation. Car deux échantillons de la même gélatine, chauffés différemment, ne se comportent pas de même vis-à-vis de la diastase, et celle qui a été chauffée le plus longtemps ou à une plus haute température perd plus vite la faculté de se solidifier par refroidissement.

Il faut aussi attendre 10-15 minutes après que la gélatine a atteint la température de 15° avant de vérifier son état, car il y a souvent un retard à la solidification. D'autre part. à cause du phénomène contraire, il ne faut pas refroidir à une température plus basse pour arriver plus vite à la solidification, si on veut revenir après à la température de 15°. Enfin il est bon, surtout dans les expériences de longue durée, d'agiter le contenu du tube avant de refroidir, pour éviter les solidifications irrégulières.

Nous nous sommes assurés que la même quantité de diastase liquéfie tous les tubes dans le même temps et que, pour des quantités différentes, le temps varie en sens inverse de la quantité de diastase employée.

La méthode proposée par Fermi (verser le liquide diastasique, dans un tube de petit calibre, sur la gélatine au thymol à l'état solide, et évaluer l'action protéolytique par le nombre de millimètres de gélatine liquéfiée) ne nous a pas donné de bons résultats. Elle s'est montrée moins précise et moins sensible, d'abord parce qu'on est forcé d'opérer à la température du laboratoire, peu favorable et surtout inconstante. De plus, rien n'assure le contact de la diastase avec la gélatine. L'action, dans ces conditions. est beaucoup plus longue, et ces diastases sont bien fragiles. Enfin il est bien plus commode et d'une plus grande sensibilité d'évaluer l'action par le temps nécessaire pour obtenir un effet déterminé, que de mesurer des millimètres.

2° *Influence de la réaction du mélange sur le pouvoir liquéfiant.* — Pour bien établir l'influence de la réaction, nous avons opéré de la façon suivante :

La réaction du liquide de culture de Raulin est variable. Dans un cas elle correspondait à 3,5 c. c. de solution décime de *Na*OH (n/10) pour 100 c. c. de liquide : avec une solution titrée d'acide tartrique on l'a portée au titre n/20. Une série de tubes de gélatine au thymol, tous pareils, ont reçu la même quantité de ce liquide diastasifère acide, et les quantités de soude et d'eau chloroformée indiquées dans le tableau suivant.

	Liquide de culture acide n/20.	Solution de NaOH n/20.	Eau chloroformée.	Liquéfaction après.
	—	—	—	—
N° 1	5 c.c.	0,0 c.c.	5,0 c.c.	62 heures.
N° 2	5	0,5	4,5	62
N° 3	5	1,0	4,0	62
N° 4	5	1,5	3,5	62
N° 5	5	2,0	3,0	74
N° 6	5	2,5	2,5	240
N° 7	5	3,0	2,0	—
N° 8	5	3,5	1,5	—
N° 9	5	4,0	1,0	—
N° 10	5	4,5	0,5	—
N° 11	5	5,0	0,0	—

Les résultats de l'expérience, exprimés en nombre d'heures à la dernière colonne, prouvent que notre diastase n'agit qu'en réaction acide. Il apparaît en outre nécessaire, pour obtenir des résultats comparables, d'opérer toujours dans les mêmes conditions de réaction.

Pendant toutes les recherches qui suivent, le liquide à essayer était porté toujours au titre n/20 en se servant de la phénolphtaléine comme indicateur.

3° *Apparition et variation de la diastase protéolytique dans le milieu, en rapport avec l'âge de la culture et les changements des substances dissoutes.* — Par les travaux antérieurs sur l'*aspergillus* cultivé sur liquide Raulin, nous savons déjà que lorsque la moisissure a atteint son degré maximum de développement, la couleur du milieu vire du jaune clair au brun ; à ce moment la quantité de substances fixes dissoutes est minime. Dans des cultures qui se sont bien développées, j'ai trouvé un extrait sec variant entre 2,15 et 1,2 grammes par litre de liquide filtré, avec une teneur de 0.6 à 0.35 gr. en cendres. La réaction du sucre a disparu, celle des nitrates est encore apparente, mais très peu sensible. L'acidité est très faible.

Le liquide de culture est donc presque complètement épuisé par le mycélium fructifié, et qui, à partir de ce moment, mûrit et se laisse macérer dans son milieu, où il abandonne peu à peu les matériaux qui le composent avec ses diastases.

En effet, si on ajoute au liquide d'une culture déjà mûre 4 ou 5 fois son volume d'alcool, ou si on le sature avec du sulfate d'ammoniaque, on peut voir se former un trouble qui, après un certain temps, donne un dépôt floconneux. La solution de tannin rend aussi le liquide opalescent et le précipite même quelquefois. Ce précipité manque dans le liquide originel, et nous sommes là en présence de produits de la vie du microbe. Nous étudierons plus tard de près la nature de ce dépôt; il nous suffit à présent de savoir qu'il contient une substance albuminoïde qui se comporte comme une albumose.

Pour étudier, pendant les divers âges du mycélium, les phénomènes physiologiques exprimés par les changements des substances dissoutes dans le milieu, en rapport avec les variations de la diastase protéolytique, nous avons opéré de la façon suivante :

On a ensemencé 10 ballons à fond plat et à double tubulure, contenant chacun 500 c. c. de liquide Raulin stérilisé, ensemencé avec des spores d'une culture pure d'*Aspergillus*. De ces cultures laissées à l'étuve à 35°, on prélevait tous les deux jours de chacune une dizaine de c. c. de liquide, avec des pipettes flambées. On mélangeait ensemble chaque fois ces prises pour avoir un échantillon de composition moyenne. Ce liquide servait pour les dosages de l'acidité, du sucre et de l'azote. De plus, à 5 c. c. on ajoutait 20 c. c. d'alcool à 95° : les tubes qui contenaient ces mélanges étaient collectionnés, et, l'expérience finie, on pouvait apprécier à l'œil les variations dans la quantité du précipité. Pour essayer le pouvoir protéolytique sur la gélatine, on prenait chaque fois 25 c. c. de ce liquide de culture, on y ajoutait la quantité nécessaire d'acide tartrique titré et d'eau pour porter le volume à 30 c. c. et l'acidité à n/20, et on en versait des quantités de 10, 8, 6, 4, 2 c. c. dans des tubes de gélatine, qu'on ramenait tous au volume de 15 c. c.

Le tableau suivant donne les résultats obtenus. L'acidité est exprimée en c.c. de la solution de soude n/10, le sucre et l'azote en grammes par litre. L'azote était mesuré par la méthode de Kjeldahl. La dernière colonne donne les durées en heures du temps au bout duquel la gélatine ne se prend plus en masse, en présence des doses de culture avec lesquelles on l'a mélangée.

Il faut d'abord remarquer que le développement de l'aspergillus dans les conditions indiquées a été plus lent que dans les

Prises de liquide.	Age de la culture.	Aspect du mycélium.	État du milieu.	Acidité 0/0.	Sucre 0/0.	Azote 0/0.	Précipité par l'alcool.	Temps nécessaires à la liquéfaction 10	8	6	4	2
1er			Jaune clair	24,5	4,45	0,042						
2e	48 heures	Voile très mince	»	26,1	4,41	—						
3e	72 »	Voile plissé	»	56,1	3,21	0,028						
4e	96 »	id.	»	46,0	1,76	0,024	Louche	264				
5e	120 »	Galette épaisse	»	25,2	0,86	0,021	Trouble	168	240			
6e	144 »	Commencement de sporulation	»	9,0	0,63	0,017	Dépôt	48	144	264	360	
7e	192 »	Sporulation complète	Jaune brun	3,5	0,25	0,027	Dépôt considérable	36	72	96	264	
8e	226 »	Mycélium mûr	brun	3,0	0,20	0,035	id.	36	36	72	144	
9e	264 »	id.	Brun et trouble	?	—	0,049	Dépôt en diminution	24	36	60	120	360
10e	286 »	En décomposition	id.	?	—	0,058	Diminution encore	24	48	72	168	264
11e	312 »	Décomposition avancée	id.	?	—	0,077	id.	48	72	96	168	

cultures à l'air libre. Au début l'augmentation de l'acidité est due à l'aération insuffisante.

Voici les faits que nous avons à relever :

D'abord la diastase augmente dans le liquide avec l'âge de la culture ; quand le mycélium mûrit et quand il entre en décomposition, la quantité de diastase atteint son maximum. Après ce moment la diastase doit être lentement détruite. Le liquide nutritif s'appauvrit pendant le développement du microbe; le sucre disparaît peu à peu; l'azote ammoniacal rapidement ; l'azote nitrique, que nous avons estimé par l'intensité de la coloration avec la diphénylamine, beaucoup plus lentement. Mais l'azote dosable par la méthode de Kjeldahl, après avoir atteint un minimum, augmente de nouveau rapidement, et dépasse considérablement la quantité primitive. Ceci fait penser que l'azote sous forme d'ammoniaque et d'acide nitrique est absorbé d'abord par la plante et assimilé ; lorsque celle-ci meurt et s'épuise, l'azote passe de nouveau dans le liquide sous une forme organique, qui se laisse doser par la méthode de Kjeldahl.

Le précipité formé par l'alcool manque jusqu'au moment où la moisissure commence à mûrir ; il apparaît alors et augmente pour diminuer de nouveau à la fin : des cultures très vieilles ne donnent plus qu'un louche très faible.

4° *Variations de la quantité de diastase dans le milieu en rapport avec différentes conditions de vie du microorganisme.* — Nous avons porté notre attention sur l'influence de l'aération, de la température et du mode d'alimentation.

a) Influence de l'aération. — Nous avons pris 12 ballons de culture d'*aspergillus* sur liquide Raulin parfaitement comparables, et nous les avons distribués en quatre groupes. Les ballons du groupe A sont laissés dans les conditions ordinaires. Ceux du groupe B, reliés à la trompe, sont traversés pendant toute la durée de l'expérience par un courant d'air. Les deux groupes C et D sont d'abord placés dans les mêmes conditions que le groupe B, mais on arrête ensuite le courant d'air, dont on empêche le renouvellement, dans le groupe C, avant la fructification, et dans le groupe D, la fructification étant bien avancée.

Des chiffres des analyses opérées, il résulte que le manque d'une aération suffisante ralentit le développement du mycélium et que l'activité protéolytique subit le même sort. Si la priva-

tion de l'air est plus complète et si le mycélium n'est pas encore mûr, tout s'arrête, le développement du mycélium comme les changements dans la constitution du milieu, et la diastase ne s'augmente que très lentement, la quantité finale restant très faible. Si on empêche l'arrivée de l'air seulement lorsque la plante est déjà mûre, la sécrétion de la diastase ne diffère en rien de ce qu'elle est dans une culture normale.

On peut donc conclure que la quantité de la diastase dans le milieu est strictement liée à l'intensité de développement du mycélium comme masse de cellules et degré de maturité. Elle n'est pas directement influencée par les conditions d'aération.

b) Influence de la température. — La température non plus ne paraît pas avoir une influence directe sur la sécrétion de la diastase protéolytique.

On a ensemencé 6 ballons en tout, comparables entre eux, et dont trois ont été portés à l'étuve à 35°, et les trois autres à celle à 25°. — L'étude du liquide a été suivie avec les mêmes règles que dans les recherches précédentes.

Les résultats fournis par cette dernière expérience ont attiré notre attention sur un fait bien intéressant. La sécrétion de la diastase dans le milieu ne paraît pas dépendre du développement actif, mais plutôt de la décomposition de la plante.

Voici pourquoi. Les cultures entretenues à 25° se sont développées et sont entrées en fructification plutôt, mais le mycélium déjà mûr s'est mieux conservé et la quantité de diastase dans le liquide à augmenté plus lentement. Dans les cultures à 35°, il y a eu un développement plus lent mais plus intense, le mycélium a mieux épuisé le liquide; bientôt après il s'est décomposé, et le liquide s'est enrichi de diastases et de substances inertes.

c) Influence du mode d'alimentation. — Le liquide Raulin est pour l'*aspergillus* le milieu nutritif de choix, et on peut, en y remplaçant méthodiquement les sels ammoniacaux par des matières albuminoïdes, chercher si celles-ci peuvent convenir à la plante, et comment elles influent sur la quantité de diastase protéolytique.

Nous avons commencé par expérimenter sur des cubes de blanc d'œuf ou des flocons de fibrine, qui n'ont pas été digérés.

On a préparé ensuite une solution de caséine purifiée dans le

carbonate de soude, qu'on a exactement neutralisée, et après l'avoir filtrée on l'a distribuée dans trois ballons : dans un premier ballon A on a ajouté 20 grammes de sucre et 2 grammes de tartrate neutre d'ammoniaque ; dans un autre, B, seulement 20 grammes de sucre, et dans un troisième C on laisse la solution de caséine seule.

Ces trois milieux après stérilisation sont ensemencés uniformément et donnent un développement très lent, qui devient toutefois considérable dans les ballons A et B après une semaine, tandis qu'il reste très maigre dans le troisième ballon C.

Voici ce qui se passe dans le milieu. Dans les deux premiers ballons, quand le mycélium commence à se développer, la caséine est précipitée, probablement par une formation d'acide. Ce coagulum forme une couche au fond du vase, et c'est seulement lorsque la plante est mûre et commence à se décomposer qu'on voit ce dépôt s'émietter et se dissoudre ensuite presque complètement. Dans le ballon C, où la plante dispose de caséine pour tout aliment, et où son développement est chétif, rien ne change dans l'aspect du milieu, qui reste homogène jusqu'à la fin.

Après trois semaines, on a prélevé du liquide de ces cultures, et après s'être assuré qu'il n'y avait pas eu d'infection par des microbes étrangers, on l'a soumis à des essais appropriés pour déterminer l'état de la caséine. On voit que, dans les deux premiers ballons, la caséine à été complètement digérée, et même profondément modifiée, puisqu'on ne trouve plus de caséine coagulable et peu d'albumoses, tandis que dans le ballon C il y a encore une partie considérable de caséine inattaquée.

Encore plus significatifs et dans le même sens sont les résultats des expériences faites dans le même ordre avec une solution à 2 0/0 de gélatine. Les trois cultures obtenues présentaient un état de développement encore plus différent : considérable dans le ballon A (contenant gélatine, sucre et le sel ammoniacal), maigre dans le ballon B (gélatine et sucre), et tout à fait insignifiant dans le ballon C (solution de gélatine seule). Les essais pour déterminer à quel point avait été poussée la digestion de la gélatine ont été effectués par la méthode d'insolubilisation de cet albuminoïde par la formaldéhyde. Ils ont montré que la digestion avait été plus intense dans le ballon A que dans l'autre B, et tout à fait faible dans le ballon C.

Nous voyons donc que la caséine et la gélatine sont bien digérées par l'*aspergillus*, mais seulement là où le développement a été plus abondant, et où la plante avait des aliments assimilables tout prêts : c'est le mycélium formé aux dépens de ces aliments qui digère et dissout la matière albuminoïde ajoutée.

Le faible développement observé, avec la gélatine et la caséine seules, tient peut-être à ce que ces matières contiennent encore une petite quantité de produits de dégradation. Quand on opère avec de la gélatine bien lavée dans l'eau froide, le développement est encore moins abondant, et ne donne que de rares filaments mycéliens qui arrivent individuellement à fructification, et finissent par former, à force de générations successives, une pellicule mince à la surface du liquide. J'ai vainement essayé d'adapter l'*aspergillus* sur les milieux albuminoïdes, et ce ne sera que lorsque j'y aurai réussi que je pourrai étudier l'influence de ce mode de nutrition sur la diastase protéolytique.

De toutes ces recherches, nous pouvons conclure que *la sécrétion de la diastase protéolytique est un fait constant de la vie du microorganisme : toutes les conditions extérieures qui peuvent l'influencer agissent d'abord directement sur le développement du mycélium.*

La quantité de diastase qu'on trouve dans le milieu paraît seulement dépendre de la masse de cellules formées et du degré de maturité qu'elles ont atteint.

L'apparition de la diastase dans le milieu ne paraît pas liée à la vie, mais bien à la mort des cellules.

II

ÉTUDE DE LA DIASTASE DANS LE MYCÉLIUM

Pour étudier la diastase protéolytique contenue dans les cellules, nous avons broyé le mycélium avec du sable, et nous avons fait macérer la pâte ainsi obtenue dans l'eau chloroformée.

Nous nous sommes proposé d'étudier les variations de la diastase protéolytique en rapport avec les changements subis par les substances qui constituent ce liquide de macération.

Dans ce but nous avons mis en train le même jour, dans les mêmes conditions, à l'étuve à 35°, des cultures d'*aspergillus niger* dans de grandes cloches à pommes de terre, qui contenaient chacune 900 c. c. de liquide Raulin stérilisé. Au bout de 36 heures nous avons commencé à prélever des cultures pour les étudier, et ainsi de suite de 48 heures en 48 heures.

L'examen a été conduit de la façon suivante :

On retire avec les doigts le mycélium d'une cloche, on l'exprime d'abord sur son propre liquide de culture, puis entre des feuilles de papier buvard, de manière à pouvoir opérer toujours de la même façon. La récolte est pesée chaque fois, ensuite placée en totalité ou en partie dans une capsule pour être séchée à l'étuve à 105°. Sur la matière sèche on fait les différents dosages dont les résultats sont inscrits au tableau n° 1.

Le liquide de culture est porté à un litre et employé aux déterminations quantitatives dont le tableau n° 2 donne les chiffres. L'acide est représenté par le nombre de c. c. de liqueur décime de soude nécessaire pour saturer 100 c. c.

En même temps on retire chaque fois de l'étuve des cultures du même âge et du même aspect, en tout comparables à celle dont on a fait l'analyse complète, et on y prélève 50 grammes de mycélium frais. Cette nouvelle récolte est mélangé avec 100 grammes de sable quartzeux lavé, et le tout est broyé à la molette sur une plaque en verre dépoli, avec très peu d'eau et en prenant soin d'éviter les pertes. La pâte obtenue, soigneusement ramassée, est jetée dans un vase gradué et additionnée d'eau choloroformée jusqu'à ce que le volume atteigne 500 c. c.. On remue pendant quelque temps le mélange et on le laisse ensuite en repos pendant 10-15 heures.

Le liquide supérieur est alors décanté et sert pour les dosages dont les résultats sont rapportés au tableau n° 3.

L'expérience résumée par les chiffres des trois tableaux ci-après nous apprend que la diastase protéolytique ne se révèle qu'en petite quantité au commencement, et augmente avec l'âge, d'abord dans le mycélium et plus lentement dans le milieu.

Le fait bien évident que dans le mycélium elle augmente d'abord et ensuite diminue, tandis qu'elle augmente toujours pendant l'expérience dans le milieu, prouve encore une fois que la diastase diffuse des cellules dans le liquide au fur et à mesure que la culture vieillit.

On est amené à faire une observation très intéressante quand on compare les chiffres qui expriment les variations de la diastase et de sa distribution avec ceux qui représentent les changements dans la constitution des cellules et dans la composition du milieu.

I. — MYCÉLIUM

Ordre de prélèvement....	I	II	III	IV
Age de la culture,.......	36 heures.	86 heures.	144 heures.	216 heures.
Aspect de la culture.....	Voile mince uni.	Voile plissé en comm. de sporul.	Peau épaisse en pleine sporulation.	Peau épaisse mais flasq. sans cons.
Poids mycélium frais gr.	11,69	46,01	65,50	67,50
Humidité 0/0...........	38,50	74,40	79,90	85,80
Poids mycélium, sec.....	7,18	12,70	13,10	9,50
Azote 0/0...............	8,12	5,05	4,66	4,55
Cendres.................	5,80	3,50	3,70	5,18
Substance organ. totale..	6,76	12,26	12,62	9,11
Azote total.............	0.583	0,641	0,610	0,431

II. — LIQUIDES DE CULTURE

Aspect du liquide........	Jaune clair.	Jaune clair.	Jaune clair.	Jaune brun.
Acidité.................	16,80	16,00	0,80	?
Saccharose total, gr.....	24,48	10,40	0,50	Traces.
Extrait sec —	26,38	11,30	0,85	0,62
Cendres —	0,714	0,320	0,300	0,276
Matière organ. —	25,666	10,978	0,550	0,446
Azote amm. et or. —	0,260	0,230	0,255	0,350
Azote nitrique —	0,222	0,028	0,032	0,030
Liquéfaction des tubes de gélatine pour.......	10 c. c.	Ap. 376 heur.	Ap. 422 heur.	Ap. 288 heu.
	8 —	— —	— 480 —	— 336 —
	6 —	— —	— 600 —	— 384 —
	4 —	— —		— 432 —
	2 —	— —		

III. — LIQUIDE DE BROYAGE

Réaction et caractère du liquide de broyage....	Très acide blanc coag. par la chal.	Très acide gris coagule par la chal.	Acide brun coagule par la chaleur.	Faibl. acide noir, se tr. par la chal.
Azote total dans 100 c. c.	0,0504	0,0612	0,0364	0,0294
— coagulable	0,0168	0,0322	0,0168	0,0098
Liquéfaction des tubes de gélatine pour..........	10 c. c. ap. 168 h.	Ap. 72 heur.	Ap. 48 heur.	Ap. 96 h.
	8 — 240	— 144 —	— 120 —	— 540 —
	6 — —	— 240 —	— 144 —	— 264 —
	4 — —	— 311 —	— 240 —	— 288 —
	2 — —		— 360 —	— 480 —

On voit au commencement la plante faire activement la synthèse des matériaux qui doivent la constituer. Le travail d'assimilation est dans sa plus grande intensité. Les cellules, qui toutes sont jeunes, travaillent non seulement à bâtir leurs parties constituantes, mais encore à préparer des matériaux

de réserve. Elles sont les plus riches en substances organiques et surtout en azote. La diastase protéolytique se montre encore peu active.

Ensuite le mycélium augmente en poids et beaucoup plus en volume, il devient plus riche en eau et en cendres. La quantité de substances organiques augmente aussi, mais dans une proportion plus faible relativement aux matériaux inorganiques. Cette augmentation est plus considérable pour les composés du carbone que pour ceux de l'azote. Ainsi la teneur en azote du mycélium a baissé, alors que la quantité totale a augmenté. Le milieu est de plus en plus épuisé. La diastase augmente alors dans les cellules. L'assimilation et la désassimilation se contrebalancent dans leurs effets.

Lorsque la sporulation est complète, les cellules ont accompli leur cycle vital; le mycélium n'augmente plus, au moins en substances organiques; les composés de l'azote les plus activement formés au début commencent les premiers à diminuer. La diastase protéolytique est au maximum dans les cellules. Les processus de désassimilation prennent le dessus, deviennent de plus en plus actifs. Le milieu de culture, qui était presque complètement épuisé après avoir fourni à la plante tout ce qu'elle a employé à sa construction et tout ce qu'elle a brûlé pour son entretien, commence à s'enrichir en matériaux organiques solubles. Nous avons pu y retrouver des produits, comme les albumoses, qui n'y étaient pas avant et qui proviennent sûrement de la décomposition du plasma cellulaire. Les filaments mycéliens se vident de leur contenu dans le liquide de culture, et ils y abandonnent leurs substances inertes et leurs diastases.

Les chiffres d'analyse du liquide de broyage sont encore plus significatifs pour démontrer qu'à l'intérieur des cellules il s'est fait un travail de synthèse des substances albuminoïdes d'abord, et une protéolyse ensuite.

La marche du phénomène, telle qu'elle ressort de nos analyses, est déterminée, par un ensemble de cellules, qui doivent se trouver en majorité au même état de développement. Cette facilité expérimentale n'est réalisable qu'avec l'*Aspergillus* cultivé sur un milieu aussi excellent que le liquide Raulin.

III

LA PROTÉOLYSE DANS LES CELLULES

Nous avons vu que dans nos cultures l'échange organique. qui a lieu à l'intérieur des cellules, se révèle d'une manière bien saisissable à deux moments distincts. C'est d'abord le travail d'assimilation qui, étant prépondérant, fait passer dans le mycélium les matériaux dissous dans le milieu. Ensuite des processus de désassimilation surviennent, et le milieu s'enrichit de nouveau.

1° *Echange de l'azote.*

Dans une expérience qui en résume plusieurs autres, lesquelles faites séparément avaient donné le même résultat, nous avons réalisé les conditions nécessaires pour mieux étudier ces phénomènes en ce qui concerne l'échange de l'azote.

Nous avons mis en train des cultures de notre moisissure dans des petits ballons qui contenaient chacun 50 c. c. de liquide Raulin stérilisé. Afin de simplifier l'analyse, on avait, dans ce cas, substitué à l'azotate le tartrate neutre d'ammoniaque en quantité correspondante pour la teneur en azote. De ces cultures entretenues à l'étuve à 35°, on a prélevé un certain nombre à divers intervalles de temps, pour différencier les divers âges, et on les a distribuées en trois groupes, qui sont soumis à l'examen suivant.

1er *groupe*. Chaque fois on sépare le mycélium de son milieu de culture. et on dose séparément l'azote dans l'un et dans l'autre par la méthode de Kjeldahl.

Ordre de prélèvement	Âge de la culture	AZOTE dans le milieu	dans le mycélium	Total calculé
—	—	—	—	—
1°	24 heures	0gr,0318	0gr,0282	0gr,0550
2°	48 —	0gr,0116	0gr,0397	0gr,0513
3°	72 —	0gr,0090	0gr,0413	0gr,0503
4°	120 —	0gr,0235	0gr,0295	0gr,0530
5°	240 —	0gr,0311	0gr,0224	0gr,0535

2e *groupe*. Le mycélium séparé de son milieu de culture est laissé 48 heures à digérer à 35° dans 50 c. c. d'eau thymolée, ensuite on chauffe pendant un quart d'heure à 100°, on sépare le mycélium du liquide et on dose séparément l'azote.

Ordre du prélèvement	Age de la culture	AZOTE dans le milieu de culture	dans le liquide de digestion	dans le mycélium digéré	Total calculé
—	—	—	—	—	—
1°	24 heures	0gr,0406	0gr,0119	0gr,0043	0gr,0568
2°	48 —	0gr,0140	0gr,0175	0gr,0099	0gr,0414
3°	72 —		0gr,0187	0gr,0212	
4°	120 —	0gr,0239	0gr,0098	0gr,0182	0gr,0519
5°	240 —	0gr,0338	0gr,0073	0gr,0133	0gr,0544

3e *groupe*. Le mycélium, séparé de son milieu de culture et additionné de 50 c. c. d'eau thymolée, est d'abord chauffé pendant 1/4 d'heure à 100° et laissé ensuite macérer à 35° pendant 48 heures. Enfin on dose séparément l'azote comme dans le groupe 2.

Ordre du prélèvement	Age de la culture	AZOTE dans le milieu de culture	dans le liquide de macération	dans le mycélium digéré	Total calculé
1°	24 heures	0gr,0333	0gr,0037	0gr,0106	0gr,0476
2°	48 —	0gr,0130	0gr,0065	0gr,0309	0gr,0504
3°	72 —	0gr,0107	0gr,0072	0gr,0281	0gr,0460
4°	120 —	0gr,0212	0gr,0068	0gr,0252	0gr,0532
5°	240 —	0gr,0320	0gr,0043	0gr,0162	0gr,0532

Des chiffres du premier groupe d'analyses, il résulte que l'échange organique de l'azote se fait en deux moments différents et de sens opposé. Par les résultats fournis par les autres deux groupes, on voit que le passage de l'azote du mycélium dans le milieu se fait aussi quand la vie du microorganisme est arrêtée. La quantité d'azote qui se dissout est beaucoup plus faible dans les essais chauffés au préalable. Cette solubilisation paraît donc due à une action diastasique, persistante après la désorganisation du protoplasma.

Cette solubilisation n'est pas limitée aux substances protéïques. puisqu'on voit toute la masse du mycélium se décomposer sans l'intervention de microorganismes étrangers. Cependant on peut dire que le mycélium en macération dans l'eau thymolée pourrait laisser se dissoudre une partie des composés azotés qui le constituent, sans que l'intervention de diastases protéolytiques soit nécessaire, et que si cela n'a pas lieu de même dans les essais chauffés au préalable, cela tiendrait aux transformations, comme la coagulation, amenées par la chaleur.

Pour me renseigner sur ce point, j'ai fait l'expérience suivante :

Dans quatre cultures comparables, âgées de 48 heures, on sépare le mycélium de son milieu, on le lave et on le chauffe à 100° pendant un quart d'heure. Ensuite, dans deux des ballons, qui contiennent le mycélium ainsi traité, on verse 50 c. c. d'un liquide de culture concentré et riche en diastase active sur la gélatine. dans deux autres le même liquide chauffé au préalable pour le rendre inactif. Après avoir gardé quelques jours ces ballons à l'étuve à 35°, on a procédé aux mêmes opérations qu'avant pour effectuer le dosage de l'azote séparément dans le liquide et dans le mycélium.

Voici les chiffres :

	Liq. diastasifère actif. AZOTE		Liq. diastasifère chauffé. AZOTE	
	dans le liquide	dans le mycélium	dans le liquide	dans le mycélium
	—	—	—	—
N° 1	0gr,0868	0gr,0098	0gr,0772	0gr,0166
N° 2	0gr,0910	0gr,0084	0gr,0700	0gr,0208

Ces résultats ne laissent pas douter que dans la solubilisation des composés azotés de la cellule entre en jeu une diastase, et que celle-ci est excrétée dans le milieu de culture.

Ici se présente maintenant la question suivante :

L'agent, ou peut-être l'ensemble des agents diastasiques, que nous avons révélés et suivis dans leurs variations par le phénomène de liquéfaction de la gélatine, sont-ils les mêmes que ceux qui accomplissent dans le protoplasma le travail de désassimilation ?

Nous croyons pouvoir répondre affirmativement à cette question. En effet, dans la suite de nos recherches, qui seront exposées dans un deuxième mémoire, nous avons retiré, des cellules d'*aspergillus*, une *diastase* des substances albuminoïdes, agissant non seulement sur la gélatine, mais sur l'albumine et la caséine. Le pouvoir protéolytique mesuré, comme nous l'avons fait, sur la gélatine, ne correspond pas exactement, peut-être, à celui que cette diastase exerce vis-à-vis des albuminoïdes de la cellule, mais les expériences *in vitro* nous autorisent à penser qu'il y a entre ces différentes actions un lien de proportionalité.

2° *Digestion dans le liquide de broyage.* — L'étude de cette protéolyse intracellulaire devient bien plus intéressante quand on fait porter la recherche sur le liquide de broyage.

Celui-ci, préparé au moyen de mycélium jeune, est d'aspect laiteux, blanc grisâtre, il filtre difficilement et incomplètement : sa réaction est nettement acide ; le chauffage le rend plus opaque et quelquefois produit des coagulums. Ce liquide donne bien manifestement les réactions du biuret, de Millon, les réactions xanthoprotéïque et celle de Adamkiewicz : mais celle de Molisch, qui met en évidence le groupe sulfuré, n'est pas du tout sensible.

Si on abandonne ce liquide à lui-même, il se sépare en deux portions, un dépôt formé de petits grumeaux sous un liquide clair, jaune miel. C'est le dépôt qui contient le plus de substances

albuminoïdes, mais le liquide en contient aussi. Cette séparation est beaucoup facilitée si l'on ajoute quelques gouttes d'acide acétique, elle est, au contraire, empêchée si l'on ajoute de l'alcali. Un excès de l'un ou de l'autre de ces réactifs amène une dissolution presque complète des particules en suspension.

La substance albuminoïde principale est donc de la nature des nucléines.

Sur le liquide acidifié et décanté ensuite, nous avons opéré la séparation des divers produits solubles au moyen du sulfate d'ammonium. La réaction de la peptone a été toujours négative, mais la présence d'albumoses bien manifeste. La tyrosine et la leucine peuvent être mises en évidence quand on évapore ce liquide à basse température.

Il y a donc à l'intérieur des cellules, comme on pouvait s'y attendre, de la matière albuminoïde avec les produits de sa dégradation jusqu'aux amides; il y a encore des diastases protéolytiques. Il est vraisemblable d'admettre que le protoplasme est le siège d'une protéolyse. Nous allons montrer que celle ci se fait aussi bien quand les albuminoïdes sont extraits de la cellule.

Geret et Hahn ont déjà établi ce fait pour le suc de levure. Avec le liquide de broyage de l'*aspergillus niger*, nous n'avons pas réussi tout d'abord à mettre en évidence cette digestion *in vitro*.

La raison de cet insuccès est que notre liquide présente une réaction trop acide qui précipite les albuminoïdes coagulables. Ceux-ci forment un dépôt floconneux, restant au fond du vase, sans se dissoudre sensiblement même après un temps prolongé. C'est seulement quand nous nous sommes avisé de modifier la réaction du mélange que nous avons pu constater une digestion. Voici comment nous avons opéré.

On a distribué du liquide de broyage, après l'avoir saturé de chloroforme, dans des petits ballons à raison de 50 c. c. chacun, et on a ajouté des quantités croissantes d'une solution de soude titrée; ensuite on a ramené, en ajoutant de l'eau dans chaque ballon, les divers liquides au même volume. On a préparé deux séries de ballons, la première a été portée à l'étuve à 35°, et l'autre aussi après avoir été chauffée à 100°.

Au bout de six jours les ballons sont retirés de l'étuve, et leur contenu, additionné de quelques gouttes d'acide, est évaporé jusqu'à dessiccation complète dans un bain marie où dans une étuve réglée à 105°. Ensuite on verse dans le ballon de l'alcool absolu et on le chauffe à l'ébullition, en ayant eu

le soin de le relier à un refrigérant à reflux. Ainsi la graisse et les autres substances extractives sont dissoutes et en même temps les albuminoïdes coagulables sont insolubilisés par déshydratation. On répète l'opération plusieurs fois, et précisément jusqu'à ce que l'alcool reste incolore. On fait passer l'alcool employé à travers un petit filtre Berzélius, qu'on garde. On épuise avec de l'eau bouillante le résidu de l'extraction alcoolique, et on filtre à travers le même papier. La partie insoluble qui reste au fond du vase et en partie sur le filtre, ne doit contenir d'autres composés de l'azote que les albuminoïde coagulables. On réunit enfin dans le petit ballon tout le résidu en y introduisant le filtre dont on s'était servi, et on passe au dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl.

Cette méthode de dosage des albuminoïdes coagulables, que nous avons introduite après l'avoir soigneusement vérifiée, est la mieux appropriée pour des semblables recherches. Elle nous a rendu de grand services.

Dans le tableau suivant se trouvent les chiffres de cette expérience.

Le liquide de broyage est acide, 50 c. c. exigent 7, 2 c. c de solution décime de soude pour virer au rouge avec la phénolphtaléine.

Chaque ballon a reçu 50 c. c. de liquide, plus

	Solution décime	Eau	Azote insoluble après digestion dans les essais non chauffés	chauffés
	—	—	—	—
1°	0,0 c.c.	10,0 c.c.	0gr,0189	0gr,0213
2°	2,0	8,0	0gr,0189	0gr,0213
3°	4,0	6,0	0gr,0196	0gr,0220
4°	6,0	4,0	0gr,0154	0gr,0213
5°	8,0	2,0	0gr,0175	0gr,0227

Les albuminoïdes extraits de la cellule subissent encore, dans des conditions où la vie protoplasmique n'est guère possible, un processus de dégradation, qui est dû par conséquent aux agents diastasiques qui l'accompagnent. Cette protéolyse est sensiblement influencée par la réaction. Elle est gênée par l'alcalinité, et devient très faible quand les albuminoïdes se trouvent à l'état de précipité.

Il y donc, là encore, une raison qui plaide en faveur de notre manière de voir. Le lien de parenté entre les agents dont nous avons suivi l'étude *in vitro*, et ceux qui opèrent au sein du protoplasma, devient plus évident du moment qu'on voit qu'ils se comportent de même vis-à-vis de la réaction du liquide.

Dans des expériences exposées plus loin, nous allons montrer que le maximum d'activité de notre diastase protéolytique se place au voisinage de la neutralité. Cela est vrai surtout pour ce qui concerne la digestion de la caséine, dont la nature chimique se rapproche le plus de celle des albuminoïdes de la cellule.

3° *Influence de la réaction sur la protéolyse intracellulaire et*

sur le développement de la plante. Notre attention a été attirée sur l'influence que la réaction du milieu peut avoir dans le phénomène d'autophagie du mycélium. A plusieurs reprises nous avions observé que tant que le milieu restait bien acide, il gardait sa couleur jaune claire, et le mycélium n'entrait pas en décomposition.

Nous avons songé alors à étudier la solubilisation de l'azote dans les mêmes conditions qu'avant, en faisant varier seulement la réaction du liquide où le mycélium était plongé. Cette expérience est résumée dans le tableau suivant.

Réaction et titre du liquide de digestion employé.			Ier GROUPE Mycélium non chauffé — AZOTE dans le liquide	dans le mycélium	Total	IIe GROUPE Mycélium chauffé — AZOTE dans le liquide	dans le mycélium	Total
	—		—	—		—	—	—
N° 1	Acide oxalique	n	0gr,0378	0gr,0511	0gr,0889	0gr,0296	0gr,0560	0gr,0856
N° 2	—	n/2	0gr,0371	0gr,0455	0gr,0826	0gr,0224	0gr,0623	0gr,0847
N° 3	—	n/10	0gr,0392	0gr,0434	0gr,0826	0gr,0203	0gr,0623	0gr,0826
N° 4	—	n/100	0gr,0462	0gr,0315	0gr,0777	0gr,0182	—	—
N° 5	—	—	0gr,0594	0gr,0336	0gr,0840	0gr,0147	0gr,0723	0gr,0870
N° 6	—	n 100	0gr,0420	0gr,0448	0gr,0868	0gr,0238	0gr,0748	0gr,1022
N° 7	—	n/10	0gr,0371	0gr,0504	0gr,0875	0gr,0445	0gr,0378	0gr,0323

Ces résultats montrent que c'est au voisinage de la neutralité que l'action protéolytique intra-cellulaire est la plus active.

Dans ce cas, les cellules étant mortes, la réaction du liquide devait bien affecter celle du protoplasma; cela ne devrait pas arriver pour les cellules vivantes; cependant l'influence de la réaction du milieu sur le développement de notre moisissure est encore manifeste.

Nous nous sommes demandé si la réaction du milieu de culture, en agissant sur les phénomènes de protéolyse, ne pourrait avoir une influence sur la durée du cycle vital de la plante. Tauret (18) a déjà établi dans ce sens l'influence d'un milieu très riche en azotate d'ammoniaque, et, d'après la description de ses expériences, il paraît probable que le retard dans la fructification signalé par cet auteur soit dû à la présence d'acide nitrique libre dans le milieu.

Nous avons transporté des galettes de mycélium jeune, encore parfaitement blanc, sur du liquide Raulin neuf, qui dans une série d'essais était neutralisé, et dans une autre était laissé à la réaction acide. Nous avons toujours vu le mycélium en contact avec

du liquide acide entrer en fructification avec un retard de 20 ou 30 heures sur celui qui avait été transporté sur le liquide neutralisé. Cependant ensuite il y avait formation de spores, même si on s'arrangeait de façon à entretenir le mycélium sur du liquide Raulin renouvelé continuellement pour le maintenir acide. Naturellement la réaction du milieu ne peut commander qu'indirectement ou d'une façon restreinte la réaction à l'intérieur de la cellule, surtout dans le cas de cellules qui nagent à la surface. Toujours est-il que le mycélium garde mieux sa consistance après la maturation s'il est mouillé dans un liquide de réaction acide.

*
* *

Après les expériences que nous venons de décrire, nous nous croyons autorisé à conclure que *dans les cellules de l'*aspergillus *il se fait un travail de désassimilation des composés de l'azote qui consiste dans une protéolyse dont l'agent diastasique peut bien être mis en évidence dans les cellules et dans leur milieu de culture.*

Or cette fonction de désassimilation, dont l'agent est présent à tous les moments de la vie au sein du protoplasma, doit être nécessairement entravée dans son œuvre lorsque la plante s'accroît. Nous avons vu que le pouvoir protéolytique, tel qu'il nous est révélé par la liquéfaction de la gélatine, est moins prononcé dans le suc de cellules très jeunes ; nous avons encore appris à connaître l'influence défavorable de la réaction acide sur la protéolyse intra-cellulaire. Mais tout cela n'explique pas encore le mécanisme d'un phénomène aussi complexe. Nos moyens d'investigation ne suffiront pas jusqu'au moment où il sera possible d'étudier les actions antagonistes à la protéolyse, les actions de protéosynthèse.

*
* *

Il se dégage de cette étude des conclusions d'ordre général.

Les résultats auxquels nous sommes arrivé ne sont pas tout à fait nouveaux dans la science. Des observations nombreuses déjà faites, par exemple sur ce qu'on appelle l'autophagie de la levure depuis l'expérience fameuse de Thénard, les expériences de Schutzemberger et les analyses de Geret et Hahn, et enfin tout récemment les travaux de Gamaleïa sur la bactériolyse, tendent à confirmer la justesse du point de vue auquel nous nous sommes placé dans l'exposé de ces recherches.

Que l'action de la diastase protéolytique doive se faire sentir aussi sur les substances albuminoïdes de la cellule qui l'a produite, tout le monde le reconnait. Mais nous voulons attirer l'attention sur la nécessité de considérer les diastases protéolytiques des microorganismes non seulement comme des agents de la digestion intra ou extra-cellulaire, mais surtout et d'abord comme des agents de désassimilation.

Raulin a déjà fait voir que la meilleure source d'azote pour l'*aspergillus* est faite de sels ammoniacaux qui n'exigent aucun travail de digestion. Nous avons vu aussi qu'il n'y a pas de rapport entre la sécrétion de diastase protéolytique et la fonction de nutrition. On a pu au contraire saisir la corrélation qui existe entre les changements dans la constitution des cellules et du milieu et la présence de cette diastase. On sait aussi suffisamment maintenant que la vie de la cellule est, à tout moment, la résultante de deux actions antagonistes, l'une d'intégration et l'autre de désintégration. C'est, dans notre pensée, la diastase protéolytique qui, chez l'aspergillus, est chargée d'une partie de ce travail, celui qui consiste à démolir les constituants albuminoïdes de la cellule : cette fonction de la faculté protéolytique est la plus essentielle et la première dans l'évolution. La fonction digestive n'est qu'une adaptation ultérieure.

A vrai dire, ces deux phénomènes de digestion et de désassimilation sont si mal définis qu'on peut dire qu'ils se confondent. La matière nutritive prise par la cellule à son liquide nutritif est-elle détruite avant d'avoir fait partie intégrante du protoplasma, qui n'utiliserait qu'un certain nombre de ses produits de décomposition, auquel cas elle est dite digérée? Ou bien doit-elle entrer dans la constitution du protoplasma avant d'être détruite, auquel cas elle est dite désassimilée? Bien fin qui pourrait nous le dire aujourd'hui. Pour le moment nous distinguons un travail qui précède l'assimilation et que nous appelons digestion, et un travail qui suit l'assimilation, et que nous appelons désassimilation. Ce que je veux dire, c'est que ce sont les mêmes diastases qui entrent en jeu dans les deux cas, ce qui est évidemment un argument pour les confondre.

BIBLIOGRAPHIE

1. DUCLAUX. — *Comptes rendus de l'Ac. d. Sc*, 1880, XCI, et *Annales de l'Inst. agronom.*, 1879-80.

2. BITTER. — *Arch. f. Hygiene*, 1886, B. V.

3. RITZ. — *Jour. Pharm. Chemie*, XVI, 8, s. 13.

4. STERLING. — *Cent. f. Bact. u. Paras.*, II Abth., Bd. I.

5. AUERBACH. — *Arch. f. Hygiene*, 1897, XXXI, 311.

6. FERMI. — *Arch. f. Hygiene*, B. XI, Heft. I; XIV, s. 1, et *Centr. f. Bact. u. Parass.*, XX, s. 387.

FERMI et BUSCALIONI. — *Annuario d. R. Ist. Botanico.* Roma, vol. VIII, 1898.

7. LINDNER. — *Mikroskop. Betriebskoutrolle in den Gahrungsgewerben*, 1895.

8. WILL. — *Ann. de la Brasserie et la Distillerie*, I, p. 302.

9. BEJERINKH. — *Centr. f. Bact.*, II, Abth. III, s. 521.

10. ARTARI. — *Wochensch. f. Brauerei*, 1897, p. 602.

11. BOULANGER. — *Ann. de l'Inst. Pasteur*, XI, p. 720.

13. HAHN. — *B. d. deuts. Chem. Gesell.*, 1898, XXXI, s. 200.

GERET et HAHN. — *B. d. deuts. Chem. Gesell.*, 1898, XXX, s. 202 und 233.

14. SALKOWSKI. — *Zeitsch. f. Biologie*, XXV. N. F. VII.

15. RAULIN. — *Études chimiques sur la végétation*. Thèse de la Fac. d. sciences. Paris, 1870.

16. FERNBACH. — *Ann. de l'Inst. Pasteur*, IV, s. 1.

17. WEHMER. — *Cent. f. Bact.*, II, Abt. B. II, s. 92.

18. TANRET. — *Journ. de Pharm. et de Chimie*, 6e série, V, 1897, p. 5.

19. SCHUTZENBERGER. — *Comptes rendus*, LXXVIII, p. 493.

20. GAMALEIA. — *Centralblatt f. Bact. und Paras*, I, Abt. 1899.

CONTRIBUTIONS A L'ÉTUDE DES FERMENTATIONS VISQUEUSES

RECHERCHES SUR LES BIÈRES A DOUBLE FACE

PAR H. VAN LAER

Professeur de chimie générale à l'École des mines du Hainaut,
Directeur des études de l'Institut de brasserie de Gand.

§ I. *Introduction.* — Il arrive parfois que des bières claires et même absolument brillantes, lorsqu'on les regarde par transparence, paraissent troubles quand on les examine par réflexion. Le liquide, placé devant les yeux dans une bouteille en verre incolore, se montre absolument exempt de corps en suspension, mais sa teinte, au lieu d'être franchement jaune ou brune, est ternie comme si on l'avait additionné d'un fluide laiteux. Le flacon, examiné du haut, paraît contenir une liqueur opaque, couleur blanc sale, avec une fluorescence jaune caractéristique. Cette maladie est très fréquente chez les faros et les lambics, mais on la rencontre parfois avec une intensité moindre dans les bières ensemencées avec de la levure. Les praticiens bruxellois désignent cette altération de leurs produits sous le nom de « double face » ou « tweeskinde », expression qui rappelle l'aspect si différent que présentent ces bières suivant qu'on les examine par transparence ou par réflexion.

La double face se rencontre aussi bien dans les faros que dans les lambics, mais elle a été moins souvent observée dans la mars, c'est-à-dire dans la petite bière du lambic. Par contre, les lambics la présentent bien plus fréquemment et à un degré très prononcé.

Quelquefois des brassins entiers sont frappés, mais dans la majorité des cas la maladie n'affecte par-ci par-là, et avec des intensités différentes, que quelques tonnes d'un même brassin.

Dans les brasseries à fermentation spontanée, que j'examinerai surtout dans ce travail, parce que c'est chez elles que la double face apparaît le plus souvent et sous sa forme la plus caractéristique, le mal se découvre généralement après le dépôt

des lies, c'est-à-dire un an et demi à deux ans après la fabrication.

Les brasseurs bruxellois ne se trompent guère dans le diagnostic de cette maladie. Il n'en est pas de même des autres, qui confondent souvent avec elle des troubles plus ou moins accentués, tels que celui qui est produit par le bacille de la tourne (*Saccharobacillus pastorianus*), ceux que l'on connaît sous le nom de troubles d'érythrodextrine et de glutine.

La vérité est qu'il arrive parfois que des moûts acidifiés spontanément avant la mise en levain donnent des bières à double reflet ; mais cet accident de fabrication, très rare, diffère complètement quant à ses causes et à ses effets de la « double face » proprement dite, telle que nous allons l'étudier et telle que nous la présentent trop souvent les bières bruxelloises à fermentation dite spontanée.

Quand on consulte les praticiens sur les causes de cette altération, on ne rencontre, en règle générale, aucune conviction bien ferme. Peu de brasseurs savent formuler à ce sujet une règle dont la rigueur n'ait été ébranlée par des exceptions plus ou moins nombreuses. Il résulte cependant d'une enquête contradictoire, que j'ai faite à ce sujet, que beaucoup de fabricants de lambic ont sinon frôlé la vérité, du moins fait quelques observations que la suite de cette étude confirmera. Ainsi, si les tonneaux dans lesquels on loge les moûts après leur refroidissement ne sont pas sains, s'ils sont moisis, il arrive fréquemment que les lambics ou les faros qui en proviennent soient à double face. Dans la plupart des brasseries à faro il est d'usage, une fois la fabrication terminée, de remiser les tonneaux après les avoir lavés et soufrés. Il importe beaucoup que le local qui sert de remise à la futaille soit bien sec, bien aéré, de façon à éviter tout envahissement des douves par les moisissures. On ne peut qu'applaudir à la pratique suivie par beaucoup de brasseurs, et qui consiste à laver la futaille, dès qu'elle vient des remises, à l'eau chaude et à la brosse, bref à la traiter comme de la futaille fraîche.

J'ajouterai que les causes d'infection de tout un brassin doivent résider, ainsi qu'on pourra bientôt en juger, dans la matière gluante gélatiniforme formée par la zooglée de certains ferments visqueux, qui se forme très facilement à l'endroit des soudures

dans les tuyaux d'entonnement fixes et indémontables.

Il n'est pas sans intérêt de dire que certains praticiens ont tenté d'établir une corrélation entre la maladie qui nous occupe et une ébullition trop courte ou défectueuse ; d'autres ont essayé d'attribuer à l'emploi de malt fortement touraillé les ennuis de fabrication sur lesquels nous allons insister.

Ce travail a été commencé en janvier 1896 : j'ai dû souvent l'abandonner à cause des nombreuses difficultés que j'ai rencontrées sur mon chemin, et dont les principales résidaient dans l'étude des organismes si variés que l'on trouve dans les bières bruxelloises. Nous allons voir que c'est à un microbe que nous devons attribuer le phénomène de la double face.

§ II. *La double face est en relation étroite avec la fermentation visqueuse.* — Dans le travail que j'ai publié en 1891 sur les bières bruxelloises à fermentation dite spontanée[1], j'ai dit que très souvent les faros et les lambics passent par une période de filage, après laquelle ils redeviennent fluides. J'ajoutais, à ce moment, que plusieurs brasseurs bruxellois émettent l'avis que les meilleurs produits sont ceux qui ont passé par cette phase de viscosité.

Je ne discuterai pas cette manière de voir assez originale, très répandue parmi les praticiens de Bruxelles ; mais quelque paradoxale qu'elle puisse paraître, elle est exacte dans un grand nombre de cas, bien entendu si on professe pour les bières bruxelloises à fermentation spontanée le respect que lui témoignent ses fabricants.

Avant d'aller plus loin, il importe d'établir que *tout moût de faro et de lambic, au moment où il est introduit dans les tonneaux de fermentation, contient des germes du filage, et qu'il n'y a pas un seul tonneau de faro ou de lambic qui ne deviendrait visqueux si on le plaçait dans certaines conditions.*

Pendant la campagne de 1896-97, on a prélevé, immédiatement après l'entonnement, une bouteille de moût de faro et de lambic d'une série de tonneaux différents. Cette opération s'est continuée pendant plusieurs semaines, de sorte qu'à un moment donné je me trouvais devant un stock d'environ 150 bouteilles.

On sait que dans la fabrication courante des bières bruxel-

1. Nouvelles recherches sur les bières bruxelloises à fermentation dite spontanée. (*Mémoires couronnés et autres mémoires publiés par l'Académie royale de Belgique*, t. XLV.)

loises à fermentation spontanée, immédiatement après l'entonnement, les fûts sont bondés : on ne les laisse communiquer avec l'air que par une toute petite ouverture, par laquelle sortent l'anhydride carbonique et l'écume noirâtre qu'on voit apparaître sur les tonneaux pendant les premières phases de la fermentation, et qui finit par boucher naturellement l'ouverture de dégagement. Les tonneaux sont abandonnés à eux-mêmes dans d'immenses magasins aussi frais que possible. La fabrication des faros et des lambics est une fabrication d'hiver : commencée au commencement d'octobre, elle se termine vers le mois de mai, dès que la température devient trop élevée. Les praticiens ont observé qu'il est impossible de brasser ces bières en été.

Ces circonstances m'ont engagé à laisser fermenter le contenu de mes bouteilles dans des conditions tout à fait opposées à celles suivies dans les brasseries bruxelloises.

Cent bouteilles ont été placées dans une chambre continuellement chauffée à 18-20° C.

La fermentation terminée, les flacons sont restés ouverts jusqu'à repos complet et apparition à la surface du liquide d'un voile de mycoderme. C'est seulement alors qu'on les a bouchés et abandonnés à la température du laboratoire. Le 15 novembre 1897, les échantillons ont été examinés. *Tous, sans exception, étaient excessivement visqueux et possédaient une double face très accentuée.* Un an après, le filage avait disparu, mais la double face persistait dans quelques bouteilles.

A la brasserie, la plupart des tonneaux dont les échantillons avaient été soutirés étaient restés sains. Le contenu de cinquante bouteilles a fermenté dans une cave très froide ; elles ont été bouchées dès que la fermentation ne fut plus sensible. Quatre seulement sont devenues filantes et à double face. On se rendra compte au § V de la cause de cette exception. Les bières saines le sont restées dans la suite.

On se trouve donc ici devant un cas spécial de la fermentation visqueuse. En règle générale, quand une bière devient filante, elle reste claire ; la matière visqueuse disparaît par la suite, et la bière ne se présente que *rarement* avec la double face. Les bières bruxelloises à fermentation spontanée se comportent généralement de la même façon, mais il peut arriver que la bière redevienne fluide en conservant indéfiniment une double teinte.

Nous comprendrons bientôt les raisons de ces différences.

§ III. *Culture et identité du microbe de la double face.* — Ce n'était pas une besogne facile que celle qui consistait à isoler le microbe de la double face. Quand on fait une culture sur plaque avec le dépôt de lambics, on n'obtient souvent aucun développement, soit que les organismes aient vécu, soit qu'ils se trouvent dans un état de faiblesse telle que leur végétation sur le moût gélatinisé est impossible. Il arrive aussi que les plaques ne donnent que des colonies de levures, de torulacées et de microbes vulgaires. Pour réussir à isoler le parasite principal, il est absolument nécessaire d'opérer sur des cellules microbiennes jeunes et vigoureuses, débarrassées autant que possible des organismes vulgaires.

Voici la méthode que j'ai suivie : des échantillons de lambics à double face d'origine et d'âge différents sont abandonnés au repos pendant plusieurs semaines dans des bouteilles hermétiquement closes, afin de prévenir l'envahissement par les mycodermes. Quand les bières sont bien dépouillées, on prélève dans chaque flacon, dans les régions supérieures, avec une pipette flambée, un centimètre cube environ de liquide qu'on introduit aussitôt dans un ballon rempli de moût stérilisé et bien clair, en même temps qu'une trace d'une levure à faible atténuation, la levure de Saaz par exemple, et cela dans le but de réserver aux microbes une large part de l'extrait contenu dans la liqueur. On laisse la fermentation se produire et s'achever à la température ordinaire. On décante ensuite les bières dans des bouteilles stérilisées qu'on remplit presque complètement et qu'on bouche avec soin. Ces bières sont abandonnées à elles-mêmes à la température du laboratoire. Petit à petit, certaines d'entre elles se clarifient, d'autres deviennent visqueuses et à double face, et produisent un dépôt abondant d'une matière blanche zoogléiforme. On délaie la matière zoogléiforme dans du moût de bière stérile, afin de rajeunir les cellules par une culture de deux ou trois jours dans ce milieu. On procède enfin à de nouvelles cultures sur plaques sur moût gélatinisé, et les colonies microbiennes obtenues sont introduites dans des ballons de culture contenant du moût stérilisé.

Au bout de trois jours d'exposition à la température ordinaire, le contenu de plusieurs flacons s'est troublé, et l'on voit à

la surface une zone glaireuse blanche très épaisse, comme si le liquide était recouvert d'une couche d'huile. Cette matière s'attache aux parois du verre lorsqu'on agite les ballons. En même temps la liqueur a pris une consistance oléagineuse.

Ces liquides contiennent souvent des mélanges d'espèces, ainsi qu'on peut s'en assurer par un simple examen microscopique ; il est donc nécessaire d'en refaire une culture sur plaque avec une quantité infinitésimale de matière et de n'employer, pour le repiquage définitif, que des plaques dont toutes les colonies sont très espacées et bien homogènes.

Examinée au microscope, une goutte d'un liquide infecté par le microbe de la double face se montre peuplée par une foule de bâtonnets de 1 μ. 7 à 2 μ. 8 de longueur sur 0 μ. 5 à 0 μ. 8 de largeur. Dans les milieux qui ne deviennent pas visqueux sous l'influence de cet organisme ou dont la viscosité a disparu, on voit les bacilles entourés d'une capsule elliptique ou allongée, au milieu de laquelle la bactérie se dessine comme une ligne plus sombre. Cette capsule est souvent étranglée en son milieu par suite d'un commencement de division. Le microbe a alors assez bien l'aspect de diplococcus et même de tétrades ou de sarcines.

Dans les cultures filantes, les capsules sont réunies par une matière zoogléiforme intermédiaire en une masse glaireuse s'écoulant comme du blanc d'œuf. Cette substance intermédiaire disparaît lorsque la période de viscosité est terminée; les microbes n'ont plus alors que leur capsule. Avec des préparations colorées et sous un grossissement de 950 diamètres, on aperçoit ceux-ci comme des bâtonnets trapus à extrémités bien nettes, non arrondies. Quand on examine ainsi un échantillon prélevé dans la zone glaireuse d'un moût filant, on voit la substance zoogléiforme disposée en un réticulum à mailles très serrées, peu coloré, dans lesquelles et au travers desquelles se trouvent les bâtonnets.

Si la propriété de rendre à la fois la bière filante et à double face était l'apanage exclusif de ce microbe, si elle ne dépendait pas plutôt de certaines conditions qui font que le liquide peut être visqueux sans présenter la fluorescence caractéristique des lambics à double teinte, le nom de *B. viscosus fluorescens* serait le nom qui conviendrait le mieux à ce ferment. Mais comme cette altération caractéristique de la limpidité peut être produite

par d'autres organismes de la fermentation visqueuse, notamment par les *B. viscosus* que j'ai étudiés jadis, comme je l'ai rencontrée dans les brasseries anglaises où existait à l'état endémique un filage produit par les coccus appartenant aux espèces décrites par Brown et Morris[1], puis par Héron[2], je préfère désigner le parasite qui fait l'objet de cette étude sous le nom de *B. viscosus bruxellensis*, qui rappelle à la fois sa propriété physiologique principale et son origine, et ne préjuge en rien de la faculté qu'il possède de laisser parfois la double face comme trace de son passage dans la bière.

§ IV. *Caractères physiologiques tirés d'un certain nombre de milieux de culture. — Influence de la composition du moût sur l'intensité du filage.* — Le *Bacillus viscosus bruxellensis* se rapproche beaucoup des *bacillus viscosus* que j'ai décrits en 1889; mais, dans des conditions identiques de culture, il s'en distingue par plusieurs points importants.

Sur plaques au moût gélatinisé, il donne lieu à de grandes colonies rondes, visqueuses, translucides, présentant plusieurs zones où les individus se trouvent sous des épaisseurs différentes. Le bord de la colonie est blanc et très régulier, le centre est jaune.

En cultures géantes sur le même milieu, il se forme, au bout d'une dizaine de jours d'exposition à la température ordinaire, une grande tache blanche dont le contour est limité par un rebord en saillie. Tout le long de ce rebord, et empiétant sur la partie plate de la colonie, apparaissent six ou sept grosses bulles visqueuses qui finissent par crever au bout de quelques jours. Quand on promène un fil de platine sur cette colonie, on peut voir, au moment où on l'écarte de celle-ci, son extrémité reliée à la culture par des filaments visqueux.

Le *B. viscosus bruxellensis* se développe aussi en surface et en profondeur sur l'infusion de viande gélatinisée. Les colonies, qui sont d'ailleurs sans caractère marqué, sont blanches, visqueuses, ne liquéfient pas la gélatine. Elles ont une tendance marquée à se développer en surface. Dans les cultures sur des tranches de pommes de terre cuites, il se forme des colonies grisâtres, visqueuses.

1. Brown et Morris, On a case of bacterial infection by air-sown organism. *Journ. of the fed. Institutes of brewing*, mars 1895.

2. Héron, *Diary for the Brewing room* pour 1899 de MM. Boake, Roberts et C°.

Le *B. viscosus bruxellensis* se développe dans l'eau de levure additionnée ou non de l'un des sucres suivants : dextrose, maltose, saccharose, lactose: le plus souvent le liquide ne devient pas filant. Cela dépend de la nature de l'eau de levure employée. Sous son influence, le lait se caille sans accuser de viscosité. Les saccharoses peptonisées dont j'ai parlé jadis dans ma note sur les fermentations visqueuses deviennent aussi gluantes.

La liqueur Mayer, que les *B. viscosus* 1 *et* 2 affectionnent beaucoup, augmente à peine en viscosité sous l'influence du *B. viscosus bruxellensis*.

Quand on ensemence du moût de bière avec quelques cellules prélevées dans l'une ou l'autre des cultures précédentes, ou bien dans un milieu liquide dans lequel le microbe se développe sans le rendre filant, il devient rapidement visqueux. La liqueur se présente alors avec des caractères analogues à ceux que j'ai décrits pour le *B. viscosus n°* 1 : le liquide se trouble, devient oléagineux ; sa surface se recouvre d'une couche glaireuse blanchâtre, envoyant des ramifications vers la profondeur. Le degré viscométrique, c'est-à-dire le nombre de secondes qu'il faut à 50 c. c. de liquide pour s'écouler à 18°C, à travers une ouverture de 3 millimètres de diamètre, va en augmentant de 17, par exemple, degré viscométrique du moût, jusqu'à 135, pour décroître et revenir au point initial au bout de six ou sept jours.

Cette décroissance de la viscosité provient de la consommation de la matière gélatiniforme qui réunit, comme nous l'avons dit, en un vaste réticulum toutes les capsules bactériennes. L'agitation ou le fouettage énergique parvient aussi à désagréger cette zooglée et à enlever au liquide sa viscosité.

Pendant la période de filage, il y a dégagement lent d'anhydride carbonique, qui apparaît sous forme d'îlots blancs à la surface du liquide. Lorsque la viscosité a disparu, la liqueur est couleur café au lait, d'une odeur désagréable de moût gâté. Au fond des ballons, on trouve un dépôt abondant d'une matière amorphe, insoluble dans l'eau, mais soluble presque entièrement dans la potasse très étendue. Cette solution est très visqueuse, et lorsqu'on la neutralise par l'acide acétique, elle se précipite sous forme d'une masse jaunâtre ayant l'aspect de fibrine cuite, mais qui, délayée dans l'eau, se sépare en membranes blanches venant flotter à la surface.

Nous avons dit que, pendant la période du filage, la surface du moût est recouverte d'une matière glaireuse blanchâtre. Celle-ci peut être très facilement séparée du liquide sous-jacent par décantation. Après séparation de cette couche glaireuse, la liqueur restante est beaucoup moins visqueuse. Nous reviendrons bientôt sur la composition de ces trois fractions.

L'intensité du filage occasionné dans le moût par le *B. viscosus bruxellensis* varie-t-elle avec sa composition? Pour répondre à cette question, nous avons fait avec le même malt des moûts de différentes densités, que nous avons ensemencés ensuite avec des cultures pures de cet organisme. Voici les degrés viscométriques constatés après 24 heures :

Moût à 7,8 Balling	80
Moût à 10,4 Balling	99
Moût à 13,0 Balling	120
Moût de lambic à 13 Balling (contenant 40 °/₀ de froment)	160

On a également ensemencé, dans les mêmes conditions, deux moûts de même densité fabriqués l'un avec du malt séché à l'air, l'autre avec le même malt touraillé. Après 24 heures, ce dernier a accusé un degré viscométrique de 76, le second de 130.

On voit donc que si les moûts de bière sont des milieux très favorables au développement des ferments visqueux, tous ne se comportent pas de la même façon; ils accusent des différences sensibles dans l'intensité de la maladie. Cette observation acquiert une grande importance si, ainsi que nous allons le faire dans le paragraphe suivant, nous parvenons à démontrer que la double face des faros et des lambics est le résultat du filage prématuré des moûts de ces bières.

§ V. *Composition chimique des lambics à double face comparée à celle des mêmes lambics sains. Concurrence de la levure et du microbe à double face.* — Les bières à double face présentent-elles une différence dans leur composition chimique essentielle avec les bières saines provenant du même brassin? C'est ce que nous allons rechercher, en mettant en regard les chiffres fournis par l'analyse de quelques lambics. Ceux-ci provenaient de brasseries différentes.

Il y avait dans 100 grammes de liquide :

	LAMBIC M		LAMBIC N		LAMBIC P	
	Bière saine.	Même bière à double face.	Bière saine.	Même bière à double face.	Bière saine.	Même bière à double face.
Extrait	5,19	5,85	6,30	6,80	2,90	7,30
Alcool	6,4	5,8	6,6	6,0	8,90	5,40
Acides fixes exprimés en acide lactique	1,042	1,022	0,940	0,892	0,624	0,704
Acides volatils exprimés en acide acétique	0,082	0,120	0,226	0,114	0,348	0,368

La double face du lambic P était excessive.

On voit que les chiffres se rapportant aux teneurs relatives en acides fixes et en acides volatils n'apprennent rien. Un lambic sain peut contenir plus ou moins d'acides fixes, plus ou moins d'acides volatils que le même lambic à double face.

Chez les bières M et N, les acides volatils soumis à la distillation fractionnée, d'après la méthode bien connue de Duclaux [1], ont fourni comme nombres de la colonne B (rapports des quantités d'acides passées dans les 10, 20, 30, 40... premiers c. c. à la quantité totale d'acide introduite dans le vase à distillation) des chiffres un peu plus élevés pour la bière malade. Chez le lambic P. dont la double face est excessive, il n'y a pas de différence appréciable pour ces deux catégories de chiffres, ainsi qu'on peut en juger.

	LAMBIC P	
	Bière saine.	Bière malade.
1.	6.6	6,6
2.	13,3	13,4
3.	20,0	20,2
4.	27,1	27,1
5.	34,4	34,5
6.	42,2	42,2
7.	50.2	50,4
8.	59,0	59,1
9.	68,7	68,8
10.	80,0	80,0

La comparaison des chiffres qui indiquent les teneurs relatives en alcool et en extrait mérite d'attirer notre attention. On

1. Duclaux, Nouveau moyen d'éprouver la pureté des corps volatils. *Annales de chimie et de physique*, 6e série, t. VIII, page 542.

voit que les lambics à double face contiennent toujours moins d'alcool et, par suite, plus d'extrait non décomposé que les mêmes bières saines. C'est évidemment que le bacille a gêné l'action du saccharomyces.

Dans cette lutte entre la levure et le microbe, celui-ci aura évidemment d'autant plus de chance de succès qu'il sera plus nombreux par rapport à la levure au début, et que les conditions de la fermentation lui seront plus propices.

L'expérience va mieux préciser la portée de cette conception :

Le 8 juin 1897, on a distribué entre dix ballons le même volume du même moût.

Désignons les cultures par les lettres A, B, C, D, E, F, G, H, I, J. Après stérilisation, ces liquides ont été ensemencés, avec les précautions aseptiques d'usage, de la façon suivante :

A. Avec 5 gouttes d'une dilution d'une levure pure de brasserie.
B. Avec 5 g. de cette dilut. de lev. et 1 gout. d'une dilut. de mic. de la doub. face.
C. — — 2 — —
D. — — 4
E. — — 6 —
F. — — 6 — —
La dilution du microbe ajoutée 24 heures après l'ensemencement avec la levure.
G. Avec 5. g. de cet. lev. et 6 g. d'une dil. de mic. DF aj. 48 h. après l'ens. avec la lev.
H. — — 60 —
I. — — 72 —
J. Avec une gout. de la dil. du mic. DF et 24 h. après, avec 5 gout. de la levure.

Les ballons ont fermenté à la température ordinaire. Après la fermentation, les bières ont été soutirées dans des bouteilles que l'on a closes hermétiquement. Le 23 octobre 1897, on les a examinées. Les bières A, B et C étaient restées saines. Toutes les autres étaient filantes et à double face. On a rangé celles-ci dans l'ordre suivant, d'après l'intensité de la double teinte : I, D, H, G, F, J, E. Chez ces dernières, la maladie était la plus accentuée. Au fond de toutes les bouteilles se trouvait un dépôt zoogléiforme abondant.

On remarquera que l'ordre dans lequel les échantillons malades sont rangés correspond à leur degré d'infection microbienne.

D'autres essais du même genre ont été répétés avec des résultats analogues.

On a déterminé dans ces expériences l'extrait et l'alcool d'une

bière à double face, et on a rapproché ces chiffres de ceux accusés par la même bière saine. Voici ces nombres :

	Extrait.	Alcool.	
Bière saine	2,290	2,5	pour 100 grammes de bière.
Bière malade	3,850	1,25	

Nous relevons donc, dans les teneurs en extrait et en alcool, des différences analogues à celles sur lesquelles j'avais appelé l'attention au commencement de ce paragraphe.

Si l'on se rappelle maintenant que les moûts de faro et de lambic ne sont jamais additionnés de levure, et que l'allure de leur fermentation dépend de la nature et du nombre des organismes qui se trouvent logés dans les pores du bois des tonneaux, on ne doit plus s'étonner de la fréquence de l'altération qui fait l'objet de cette étude.

Pendant la première quinzaine qui suit l'entonnement, l'atténuation apparente de ces bières est à peine de 10 0/0 ; au bout de six semaines, de 20 à 40 0/0 ; au bout de trois mois, 61 0/0. On comprend que si les microbes de la double face sont un peu nombreux au début, ils disposeront d'un champ d'action très vaste : alors que les ferments visqueux que l'on trouve généralement en brasserie ne font sentir leur effet que plusieurs semaines, quelquefois plusieurs mois après la fermentation, dans les brasseries bruxelloises à fermentation spontanée ils peuvent utiliser des aliments différents de ceux que l'on rencontre dans la bière après fermentation.

On trouve dans ces conditions spéciales d'existence du microbe, si différentes de celles que l'on rencontre dans les bières ensemencées avec de la levure, le caractère spécial que présente le filage dans certains faros et certains lambics. Nous avons dit, en effet, que dans les bières ensemencées avec de la levure, ce n'est que dans les cas exceptionnels que le filage se présente avec la double face ; le plus souvent, lorsque la viscosité a disparu, la bière est acide, mais encore claire ; chez les lambics et les faros, au contraire, dans lesquels le ferment visqueux aura attaqué les aliments de choix destinés à la levure, la viscosité sera accompagnée de double face, et celle-ci persistera lorsque le liquide aura repris sa fluidité. Mais on comprend également que si le ferment visqueux est peu abondant ou dans un état qui en

rende le rajeunissement pénible, la bière bruxelloise se comporte, à ce point de vue, comme une bière ensemencée avec de la levure et donne lieu à un filage normal sans double face. Enfin, on conçoit que dans les brasseries où les moûts sont additionnés de levure, on puisse avoir des bières visqueuses accompagnées de double face lorsque le microbe aura été assez abondant et assez vigoureux pour disputer aux *saccharomyces* une partie de leurs aliments de choix. Aussi n'est-il pas rare, dans les brasseries où le filage existe à l'état pour ainsi dire permanent, de rencontrer, à côté de brassins entièrement visqueux et sans double face, des bières présentant à la fois la viscosité et la double teinte.

Si nous rapprochons maintenant ces observations de celles du paragraphe précédent, touchant l'influence exercée sur l'intensité du filage par la nature du moût, on se rend aisément compte que le degré de contamination capable de laisser la double face dans certaines bières, sera insuffisant pour produire cet effet dans d'autres. C'est la raison pour laquelle cette affection frappe de préférence les bières fromentacées, par exemple les produits bruxellois à fermentation spontanée et, parmi ceux-ci, le lambic et le faro plutôt que la mars.

§ VI. *Variations de la virulence des* B. viscosus bruxellensis. — Nous avons vu plus haut que le *B. viscosus bruxellensis* se développait souvent, dans les milieux dans lesquels les aliments minéraux et azotés mis à la disposition des ferments étaient fournis sous forme d'eau de levure, sans qu'il y ait production de filage.

Le microbe n'en conserve pas moins, même après une existence prolongée dans ces liqueurs, la faculté de rendre visqueux le moût de bière ; on peut s'en rendre compte aisément en introduisant après la fermentation un peu des liquides précédents dans du moût. Celui-ci redevient rapidement filant, sans que toutefois le degré de viscosité atteigne celui des mêmes cultures inoculées avec des semences prises à d'autres moûts.

En d'autres termes, l'éducation peut modifier dans des limites très larges la faculté que possède le *bacillus viscosus bruxellensis* de produire le filage dans un milieu approprié. C'est ce que montrent les chiffres suivants, qui se rapportent au degré viscométrique *maximum* atteint par différentes portions d'un moût

ensemensé avec des semences du *bacillus viscosus bruxellensis* prises à différentes sources ;

Degré viscométrique du moût	18
Inoculé avec semence prise dans un autre moût	114
— — — dans culture sur pommes de terre	126
— — — dans culture sur albumine	140
— — — dans bouillon gélatinisé	140
— — — — — recouvert d'huile	180
— — — moût gélatinisé	82
— — — eau de levure dextrosée	58
— — — une bière pasteurisée	20
— — — une autre bière pasteurisée	49

Lorsque le microbe vieillit dans un moût exposé au contact de l'air pur, dans un ballon de Pasteur, il finit par perdre définitivement la propriété de rendre filant un nouveau moût. Il en est de même si pendant la période de développement la culture est continuellement aérée.

En l'absence de l'air dans des moûts liquides et surtout dans les milieux gélatinisés recouverts d'une couche d'huile, le microbe se développe péniblement, mais il conserve toute sa virulence. Les semences les plus actives, à ce point de vue, sont celles qui proviennent de bouillon gélatinisé complètement soustrait au contact de l'air par une couche d'huile.

Ces faits, joints à quelques autres relatés au cours de ce travail, touchent à l'un des points les plus délicats de cette étude.

Tous ceux qui ont eu l'occasion d'étudier le filage ont dû observer des bizarreries dans les manifestations de ce que j'appellerai « la fonction visqueuse » des agents de ces fermentations. Ainsi, s'il est très facile de rendre filant du moût au moyen de cultures pures d'un ferment visqueux quelconque, il n'en est pas de même de la bière, qui se comporte à ce point de vue comme de l'eau de levure.

D'un autre côté, il arrive souvent de ne plus pouvoir provoquer de filage au bout d'un certain temps au moyen de semences qui jusque-là avaient manifesté d'une façon régulière leur action si caractéristique.

Certaines eaux de levure non sucrées stérilisées, ensemencées aujourd'hui avec un *bacillus viscosus* quelconque, se laissent envahir par le ferment sans produire de filage, puis un beau jour on les trouve excessivement visqueuses. J'en trouve des exemples nombreux dans mes notes de laboratoire. Ainsi, une eau de

levure parfaitement brillante, ensemencée le 20 juin 1899 par un *B. viscosus* issu d'une culture en moût, se trouble les jours suivants, mais ne manifeste pas les moindres signes de viscosité jusqu'au 22 août 1899, soit après plus de deux mois. Cette eau de levure s'est donc comportée comme de la bière qui deviendrait filante après plusieurs semaines d'embouteillage.

Ce que j'ai dit plus haut des modifications qu'un ferment visqueux peut subir par suite de son éducation rend compte de plusieurs des caprices de ces microbes. Mais, comme nous allons le voir, l'apparition plus ou moins rapide et l'intensité de la fonction visqueuse dépendent aussi de la composition chimique du terrain sur lequel on force à vivre ces organismes.

Nous avons déjà dit qu'une bière, dans la constitution de laquelle entre le froment, devient très facilement filante. Les brasseries bruxelloises à fermentation spontanée en savent quelque chose.

Dans la note que j'ai publiée en 1889 sur les fermentations visqueuses, j'ai établi aussi le rôle important que joue dans l'intensité du filage la teneur du milieu de culture en matières azotées. Les expériences suivantes corroborent cette manière de voir.

Si, à de l'eau de levure dextrosée, on ajoute un peu de peptone ou mieux de l'asparagine, le filage se déclare régulièrement après quelques jours de culture à la température ordinaire. Le filage apparaît plus vite encore et avec plus d'intensité si on neutralise exactement l'acidité de l'eau de levure.

Voici ce qui fait encore mieux toucher du doigt cette action des ferments visqueux sur les matériaux azotés de leur milieu de culture.

Si, à du moût redevenu fluide après avoir passé par une période de filage, on ajoute une solution stérile d'urée ou d'asparagine, le liquide redevient visqueux. La liqueur, traitée par assez peu d'alcool pour empêcher une précipitation de dextrines, donne une masse qui s'agglomère rapidement en une substance gommeuse, par l'agitation avec une baguette de verre. Cette masse peut très facilement être séparée de la liqueur mère par simple décantation. Mise en contact avec de l'eau, elle s'y redissout lentement en la rendant visqueuse. Reprécipitée par l'alcool et redesséchée, elle donne un corps brun, amorphe, d'aspect

vitreux ressemblant à de l'albumine séchée. Soumise à la méthode de dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl, cette substance a fourni dans différentes préparations les chiffres suivants :

	AZOTE POUR CENT DE MATIÈRES SÈCHES
Matière zoogléiforme superficielle (décantée)	5,390
— — (autre préparation)	5,690
Matière zoogléiforme sous-jacente	1,649
— — (autre préparation)	0,7602
Dépôts obtenus après filage (après dissolution dans KOH étendu, filtration pour retenir les cellules et reprécipitation par l'acide acétique)	11,61

Ces dépôts sont formés par les cellules microbiennes entourées seulement d'une capsule. On voit d'après ces chiffres que la capsule est de nature azotée, et que la matière zoogléiforme intermédiaire contient, en dehors de la substance qui entoure les cellules, des composés de nature ternaire.

Le microbe de la double face modifie donc à la fois les matériaux azotés et ternaires de son milieu de culture. Nous reviendrons plus loin sur cette dernière action.

§ VII. *Symbiose du B.* viscosus bruxellensis *avec d'autres organismes.* — Héron [1], en opérant sur un coccus isolé de bières filantes anglaises, a établi que des cultures pures de ce microorganisme ne sont pas capables de provoquer le filage dans du moût ou de la bière stérilisée. Le microbe s'y développe comme le *B. viscosus bruxellensis* dans l'eau de levure, sans jamais manifester de filage.

Il n'en était pas de même lorsque l'auteur introduisait dans du moût quelques cellules de levure de culture pure en même temps que le ferment filant. Dans ces conditions, le filage se manifestait au bout d'un petit nombre de jours. Héron explique en conséquence l'apparition du filage dans les bières anglaises de la façon suivante : « Lorsque le ferment filant se trouve seul dans le moût, n'étant pas capable d'entamer la molécule de sucre, il ne peut pas exercer son action et produire le filage ; mais quand il y a aussi de la levure en présence, la cellule de levure désagrège la molécule de sucre et par là elle met à la disposition de son associé la matière nutritive dont il a besoin pour se développer ; c'est alors que la bière est atteinte de viscosité. »

1. *Loc. cit.*

Je ferai observer de suite que, d'après Héron lui-même, l'organisme qu'il a étudié se développe dans le moût et dans la bière, mais qu'il n'y produit pas de matière visqueuse. Comme nous l'avons vu pour le *B. viscosus bruxellensis*, celle-ci est produite au moins en partie au détriment des matières azotées du milieu de culture.

L'auteur n'a pas envisagé cette dernière question, et s'il est vrai que le filage des bières anglaises résulte exclusivement d'une modification de leurs hydrates de carbone, les cellules de levure leur feraient donc subir une transformation qui les rendrait plus aptes à être utilisés par ces coccus, pour la production de matière visqueuse.

Revenons maintenant au *B. viscosus bruxellensis*. Nous avons vu que cet organisme rend directement le moût filant et que celui-ci, après avoir passé par une période de viscosité plus ou moins intense suivant sa composition, finit par reprendre sa consistance primitive.

Il n'en est pas de même lorsqu'il est associé avec certains organismes très communs dans les bières, tels que les *mycoderma cerevisiæ*.

Du moût ensemencé par le *B. viscosus bruxellensis*, et redevenu fluide, reprend très souvent sa viscosité lorsqu'on introduit dans la liqueur quelques cellules de *mycoderma cerevisiæ*. Je dis très souvent, parce que le mycoderme ne se développe pas dans les liqueurs très acides. On sait que 1 0/0 d'acide acétique s'oppose à la croissance de cette plante. Il arrive aussi que beaucoup de lambics ensemencés avec ce champignon ne donnent lieu à aucun développement, tandis qu'il s'y multiplie invariablement lorsqu'on diminue leur acidité en ajoutant du carbonate de soude.

Des cultures redevenues visqueuses sous l'influence du mycoderme le restent pendant très longtemps. Des moisissures communes, tels que le *penicillium glaucum* et l'*aspergillus niger*, se comportent de la même façon, pourvu qu'on les force à rester submergées. Si le développement des mycodermes se fait en surface, leur végétation est assez vigoureuse pour empêcher toute croissance des *B. viscosus*, même lorsque ceux-ci sont ajoutés au moût en très grande quantité et à l'état de cellules jeunes.

Si l'on songe maintenant que le *mycoderma cerevisiæ* et les moisissures se multiplient encore d'une façon abondante dans des milieux à peu près exempts d'hydrates de carbone, tels que l'eau de levure, sans ajouter de sucre, on est bien forcé d'admettre, surtout en présence de ce que nous avons dit dans le paragraphe précédent sur l'origine de la matière visqueuse, que dans ces associations le mycoderme ou la moisissure dégrade les substances azotées restées dans le milieu de culture, et les présente aux ferments visqueux sous une forme qu'ils utilisent aisément pour la production de leur capsule gélatineuse.

§ VIII. *Action du B.* viscosus bruxellensis *sur les hydrates de carbone du milieu de culture.* — En cultivant le *B. viscosus bruxellensis* dans du moût et d'autres liqueurs nutritives contenant de la dextrose, de la saccharose, de la maltose ou de la lactose, on peut s'assurer très facilement que le microbe fait disparaître une portion de la matière ternaire.

D'autre part, l'acidité de la liqueur va en augmentant; lorsqu'on additionne la culture de carbonate de chaux de façon à provoquer la neutralisation des acides au fur et à mesure qu'ils prennent naissance, le ferment peut en une dizaine de jours consommer 75 0/0 de la quantité de dextrose mise à sa disposition dans des solutions d'eau de levure contenant 10 0/0 d'hydrate de carbone. Toutes autres choses égales, la dextrose disparaît d'abord, puis viennent la saccharose, la maltose et la lactose. La saccharose est consommée sans que l'on trouve, à aucun moment de la culture, du sucre interverti dans la liqueur.

Dans les cultures en moût, il y a, comme nous l'avons dit, dégagement d'un peu d'anhydride carbonique : il y a aussi production de traces d'alcool.

L'acidité augmente au fur et à mesure que le degré viscométrique décroît.

Les acides élaborés aux dépens du sucre consistent principalement en acide lactique ordinaire et en acides gras. Ceux-ci, soumis à la distillation fractionnée d'après la méthode de Duclaux, donnent des nombres qui vont en diminuant; quelquefois l'acidité, après avoir diminué au commencement, augmente un peu vers la fin.

Voici les nombres fournis par l'étude de la distillation des acides volatils produits par le microbe de la double face dans différents milieux.

MILIEUX NON ADDITIONNÉS DE CRAIE

	Moût houblonné		Moût non houblonné	
	A	B	A	B
1	1,6	10,5	1,75	12,1
2	1,5	20,5	1,50	20,2
3	1,4	23,1	1,45	33,3
4	1,3	38,4	1,30	46,3
5	1,2	41,3	1,15	50,3
6	1,1	53,6	1,10	57,9
7	1,1	60,9	1,00	64,8
8	1,0	67,5	0,95	71,5
9	1,2	75,4	1,00	78,4
10	1,5	85,4	1,10	86,1
Reste	2,2		Reste 2,0	

Ces nombres correspondent à un mélange d'acide butyrique et d'acide acétique.

Les chiffres suivants se rapportent aux acides volatils obtenus dans des milieux additionnés de carbonate de chaux, après ébullition, décomposition de sels de chaux par l'acide oxalique, filtration, distillation jusqu'à obtention de 110 c³ de distillat.

	EAU DE LEVURE DEXTROSÉE (10 %)				EAU DE LEVURE SACCHAROSÉE (10 %)	
	N° 1		N° 2			
	A	B	A	B	A	B
1	3,8	15,5	3,55	19,2	5,55	14,3
2	2,9	27,3	2,80	34,5	4,70	26,4
3	2,5	37,5	2,20	41,	4,05	36,9
4	2,0	45,7	1,80	56,2	3,55	46,1
5	1,7	57,6	1,50	64,4	3,20	54,3
6	1,7	59,5	1,15	70,6	2,90	61,8
7	1,6	66,1	1,00	76,	2.70	68,8
8	1,5	72,2	0,90	80,9	2,60	75,5
9	1,7	79,1	0,75	85,	2,55	82,4
10	2.0	87,3	0,80	89,4	2.80	89,4
Reste	3,1		2,00		4,10	

On voit que ces mélanges sont plus riches en acide butyrique. Dans l'eau de levure dextrosée n° 2, les acidités des premières prises sont supérieures à celles de l'acide butyrique normal, par suite de l'existence d'un peu d'acides gras supérieurs.

Si nous rapprochons ces conclusions de ce que nous avons dit, au § V, de la teneur et de la composition des acides volatils des lambics à double face (les chiffres B donnés pour les lambics sont inférieurs à ceux que nous trouvons ici, à

cause des fermentations acétiques dont les bières bruxelloises à fermentation spontanée sont le siège), nous devons conclure que l'action fermentative du *B. viscosus bruxellensis* à l'égard des sucres est indépendante de celle qu'il exerce sur les matières azotées de son milieu de culture.

Le microbe altère dans le moût ces dernières pour donner des filages suivis de double face; mais indépendamment de cela, c'est un ferment des hydrates de carbone, aux dépens desquels il produit de l'acide lactique et des acides gras, soit qu'il attaque les sucres directement, soit que son activité se porte sur les matières gommeuses produites aux dépens des hydrates de carbone. En d'autres termes, entre un lambic qui est resté clair après être devenu visqueux et un lambic à double face, il y a cette seule différence que chez le second l'infection par les *B. viscosus bruxellensis* s'étant produite dès l'origine, les matières azotées de choix contenues dans le milieu de culture ont été modifiées, et cela indépendamment de l'action commune à ces deux variétés de fermentation visqueuse qui s'exerce sur les hydrates de carbone ou sur les composés gommeux qui en résultent.

Si nous songeons maintenant à ce fait que, dans le filage suivi de double face, le rajeunissement des bacilles, dès le début de la culture dans un milieu aussi nutritif que le moût de bière, exalte leur virulence; que l'envahissement des lambics, contenus dans des fûts dans lesquels l'air a pénétré, par les *mycoderma cerevisiæ*, est de nature à entretenir le filage en l'aggravant de l'altération des matières azotées restantes, nous aurons synthétisé tous les résultats de ce travail en une formule qui permettra de se rendre compte de la plupart des cas que nous offre la pratique.

L'ACTION DU SÉRUM SANGUIN SUR LE VACCIN

Par M. KODJABASCHEFF
Directeur de l'Institut vaccinal de Sofia.

Comme supplément au mémoire sur l'*immunité vaccinale* publié par MM. Béclère, Chambon et Ménard dans le numéro de février 1899 de ces Annales, je crois qu'il serait intéressant de rapporter mes observations et mes expériences.

Pendant le deuxième semestre de 1897, j'ai remarqué que le vaccin qui contenait du sang et du sérum sanguin donnait de mauvais résultats. Les génisses que nous avions inoculées à l'Institut avec du vaccin rouge[1] ne donnaient pas toutes des pustules vaccinales. J'ai constaté aussi que le vaccin rouge ne durait pas longtemps; il se décomposait, il se putréfiait.

Au mois de mai 1897, je m'adressai à M. le Directeur de l'Institut Vaccinal Libre Économique de Saint-Pétersbourg, en le priant d'envoyer pour notre Institut 5 grammes de leur vaccin pour améliorer le nôtre. Le 21 mai, je reçus la matière vaccinale qui avait une coloration rouge comme le sirop de framboises : elle contenait une certaine quantité de sang. Le 28 mai, j'en inoculai une génisse selon le procédé classique, en observant toutes les règles de l'asepsie. Au moment de l'inoculation de l'animal, la température était à 38°, et pendant toute la durée de la période vaccinale, son maximum ne dépassa pas 38°.7; les boutons vaccinaux n'étaient pas développés, ils étaient tout à fait secs et nous n'obtînmes point de vaccin. Je fus fortement impressionné par ce fait que le vaccin rouge agissait peu sur l'organisme.

Pendant le mois de juin 1897, j'inoculai quatre génisses avec du vaccin rouge; je remarquai que, pendant toute la durée de la période vaccinale, elles eurent une élévation de température modérée, leurs boutons vaccinaux présentèrent quelques phéno-

1. Pour abréger la phrase, j'appelle vaccin rouge celui qui contient du sang ou du sérum sanguin.

mènes inflammatoires et, vers le sixième jour, époque de la récolte, ils étaient tout à fait secs.

De la génisse n° 130, je recueillis à part seulement de la lymphe mélangée avec du sang qui coule après l'enlèvement de la pince. Le 13 septembre 1897, avec cette lymphe, j'inoculai quelques boutons à la génisse n° 132, inoculée avec le virus vaccinal de la même génisse 130. Les boutons inoculés avec le virus vaccinal étaient suffisamment développés, tandis que les boutons inoculés avec la lymphe rouge ne l'étaient pas : on n'y observait aucun phénomène inflammatoire, comme s'ils avaient été simplement écorchés. Cette expérience m'amena à penser que la lymphe contenant du sang et du sérum sanguin n'agissait pas sur l'organisme.

Non seulement le vaccin rouge donnait de mauvais résultats, avait peu d'activité, mais je constatai aussi qu'après un ou deux mois, même dans la glacière de l'Institut Vaccinal, à la superficie du flacon il se formait une couche microbienne.

Dans le courant de mes observations sur le vaccin rouge, j'étudiai aussi les effets du vaccin incolore : je constatai que le vaccin qui ne contenait ni sang ni sérum sanguin donnait de meilleurs résultats, durait fort longtemps et ne se décomposait pas.

De la matière vaccinale de trois génisses, je pris seulement la croûte et la lymphe se trouvant directement sous la croûte ; je recueillis ce vaccin avec la spatule, sans l'aide de la pince, afin d'éviter de prendre la moindre trace de sang et de sérum sanguin. Ainsi formé, ce vaccin était incolore et donna 85 0/0 de succès à la vaccination et à la revaccination.

En continuant mes observations dans la même direction, et comparant les résultats obtenus avec le vaccin rouge et le vaccin incolore, je commençai à soupçonner que la présence du sang et du sérum sanguin dans le virus vaccinal de la même génisse était l'une des principales causes qui diminuait l'activité du vaccin.

Mes observations ultérieures me donnèrent l'idée de faire et de répéter l'expérience suivante : d'une même génisse, nous recueillions deux espèces de vaccin : l'un qui contint du sang et du sérum sanguin, l'autre qui n'en contint pas. La deuxième espèce de vaccin sans traces de sang et de sérum sanguin me donna toujours de meilleurs résulats.

Après ces observations et ces expériences, j'étais convaincu que le sérum sanguin avait une action opposée à celle du vaccin lorsqu'ils étaient mélangés : je l'écartai alors complètement; nous faisons donc la récolte de la matière vaccinale rien qu'avec la spatule sans pince, en prenant la croûte, la lymphe sise sous la croûte, et, pour éviter la moindre trace de sang, nous passons une seule fois la spatule. Le vaccin ainsi formé est incolore, dure longtemps, de 6 à 9 mois, ne se décompose pas et possède une grande activité.

Les observations suivantes sont très intéressantes au point de vue de l'activité et de la durée du vaccin exempt de sérum sanguin :

a) N° 19, recueilli le 28 mars 1898, inoculé le 25 juin, plus de deux mois et demi après la récolte : succès, 95 0/0 à la vaccination et à la revaccination ;

b) N° 22, recueilli le 29 mars 1898, inoculé le 30 juin, trois mois après la récolte : succès 93 0/0;

c) Nos 24 et 25, recueillis le 30 mars 1898, inoculés le 15 octobre, 6 mois après la récolte : succès 85 0/0 ;

d) De ces mêmes nos 24 et 25, le 31 août, 10 flacons furent envoyés à un vaccinateur en province, qui les inocula du 9 au 18 décembre avec 85 0/0 de succès, à la vaccination et à la revaccination, c'est-à dire que ces nos 24 et 25, après avoir séjourné trois mois et demi hors de la glacière de l'Institut vaccinal, et neuf mois après la récolte, donnèrent encore une réussite de 85 0/0.

Je dois rappeler que les mêmes vaccins furent conservés dans l'Institut et furent inoculés pendant les chaleurs de l'été dont on connaît l'influence sur les décompositions.

Le nouveau procédé de récolte de la matière vaccinale exempte de sérum sanguin fut introduit par moi au commencement de l'année passée 1898, et, dans mon rapport n° 592 du 23 juin 1898, j'en donnais connaissance à M. le Président du Conseil sanitaire supérieur; dans ce rapport, j'expliquais les raisons qui m'avaient guidé pour l'introduction du nouveau procédé.

Jusqu'à la fin de 1897, nous faisions la récolte du vaccin selon le procédé suivant : avec la pince, nous enserrions le bouton vaccinal, nous prenions la croûte de la pustule vaccinale, la lymphe sise sous la croûte et la lymphe qui coulait après

l'enlèvement de la pince : ce mélange formait la matière vaccinale qui, d'habitude, avait une coloration rosée.

La statistique nous montre que le résultat des vaccinations et des revaccinations pour les années 1895, 1896, 1897 fut de 69 0/0, 71 0/0, 74 0/0 de succès; tandis que, pour l'année passée 1898, nous avions un chiffre de 83;16 0/0. Pour l'année courante jusqu'à la fin du mois d'octobre, nous avons un chiffre de 80,55 0/0, bien que, pendant le premier semestre, on ait eu à vacciner les conscrits; or, pour la majeure partie des soldats, c'est une revaccination qu'on fait.

Pendant l'année 1895, on a inoculé à l'Institut 83 génisses, dont 56 réussies et 27 non réussies. En 1896, on a inoculé 303 génisses, dont 228 réussies et 75 non réussies. En 1897, on inocula 139 génisses, dont 121 réussies et 18 non réussies. En 1898, on inocula 40 génisses et toutes réussies; pendant l'année courante jusqu'au premier de ce mois-ci, on avait inoculé 14 génisses toutes réussies.

Comme je viens de le dire, jusqu'à la fin de 1897, nous mélangions la lymphe rouge avec la matière vaccinale : je crois donc que c'était la lymphe rouge qui diminuait l'activité du virus vaccinal et qu'elle était la cause, pour les années 1895, 1896, 1897, du nombre considérable de 120 génisses non réussies, tandis que celles qui avaient réussi avaient leurs boutons vaccinaux peu développés relativement à ceux des génisses vaccinées pendant 1898 et 1899, et je crois que la matière vaccinale exempte de sérum sanguin doit avoir réellement une activité beaucoup plus grande.

APPAREILS A RÉCOLTER LE SÉRUM SANGUIN

Par M. A. LATAPIE

Aide au laboratoire de M. E. Metchnikoff.

Les méthodes généralement employées pour recueillir le sang qui doit servir à la préparation du sérum présentent, grâce à la complexité des manœuvres qu'elles exigent, des chances assez nombreuses de contamination ; de plus, le caillot, une fois formé, ne livre pas tout le sérum qu'il contient ; une bonne quantité reste emprisonnée dans les mailles de la fibrine et se perd.

C'est dans le but d'atténuer ce double inconvénient que nous avons construit les deux appareils que nous décrivons ici. Les chances de contamination s'y trouvent, en effet, singulièrement diminuées, puisqu'il ne peut y avoir de contact entre le liquide et l'air extérieur depuis le moment où l'on ponctionne le vaisseau de l'animal jusqu'à celui où le sérum est recueilli dans son récipient définitif.

De plus, en divisant le caillot au moyen d'une série de tubes de verre plongeant dans la masse sanguine, nous l'obligeons à livrer une quantité de sérum infiniment plus considérable que celle obtenue par les procédés habituels.

Nous présentons ici deux appareils fondés tous deux sur le même principe : l'un destiné à recueillir le sang chez les petits animaux de laboratoire : lapin, cobaye, rat, pigeon, etc. ; l'autre servant à saigner les animaux de grande taille : cheval, âne, bœuf, chèvre, etc. En voici la description sommaire :

1° Appareil pour recueillir le sang chez les petits animaux.

Il se compose essentiellement de deux parties : un tube trocart (A) (fig. 1) destiné à ponctionner le vaisseau ; un réservoir-pipette (B) destiné à recueillir le sérum.

Le tube trocart (A) est un tube à expérience ordinaire ouvert à une extrémité ; à l'autre, il se termine par une courte effilure coudée, très aiguë et fermée à la lampe.

Le réservoir pipette (B), d'un diamètre un peu supérieur à

celui de A), est un tube en verre, étranglé légèrement en son milieu, ouvert à sa partie supérieure, fermé par le fond et portant à ce niveau une longue effilure (E) coudée deux fois, qui sert à l'écoulement du sérum. Sur le milieu de la hauteur une tubulure (T), bouchée avec de la ouate, permet l'accès de l'air dans l'appareil.

Le fond porte de plus une ampoule (M). L'extrémité ouverte du tube trocart s'emboîte dans l'ouverture du réservoir pipette ; les deux sont reliées l'une à l'autre par une bague de caoutchouc (C). A l'intérieur de l'appareil est placé librement un tube en verre (V) fermé à un bout, ouvert à l'autre, percé de trous.

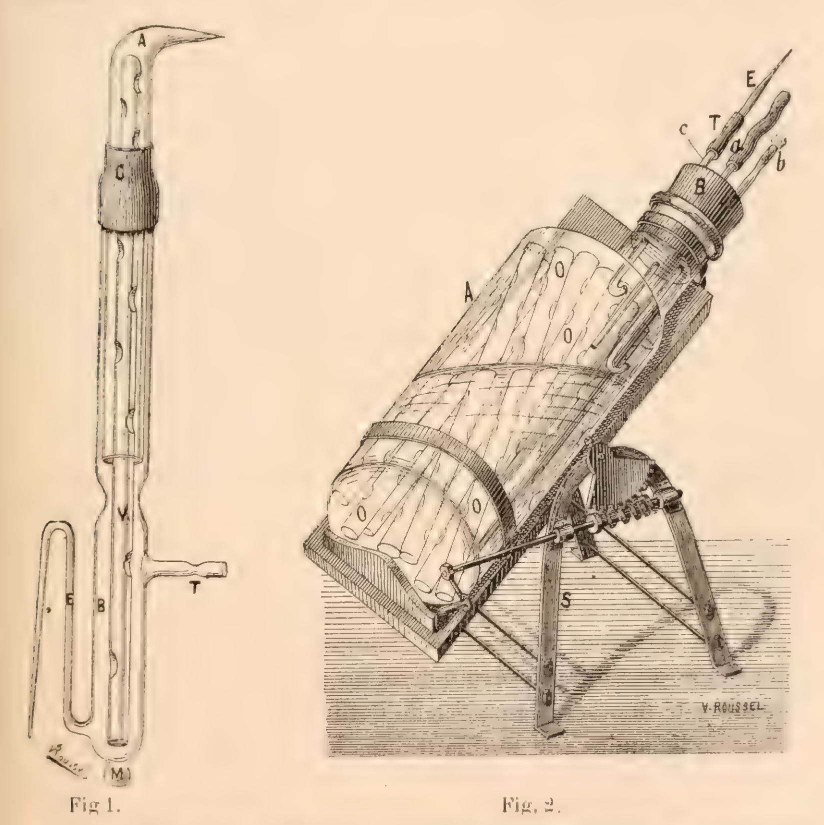


Fig 1. Fig. 2.

Ce tube servira de noyau autour duquel viendra se rétracter le caillot. On peut fixer ces appareils sur des supports avec pinces pour faciliter la manipulation.

Mode d'emploi. — Supposons qu'il s'agisse de saigner un cobaye. L'appareil, dans lequel on a laissé quelques gouttes d'eau, a été préalablement stérilisé à l'autoclave à 120°. L'animal, couché sur le dos, est fixé sur l'appareil contenteur; son cou est rasé, lavé, désinfecté au sublimé. On fait à la peau une longue incision médiane et l'on découvre une carotide ; l'artère est isolée sur la sonde cannelée ; une première ligature est placée sur le bout supérieur et serrée fortement; une seconde est placée sur le bout inférieur, mais non serrée : on ne la serrera que l'opération terminée, pour arrêter l'hémorragie. Sur le bout inférieur, on place encore une pince à forci-pressure, distante de la ligature supérieure de deux centimètres environ. On flambe et l'on casse en sifflet avec une pince stérile l'effilure du tube (A), on enfonce la pointe dans l'artère, dirigée vers le cœur, en maintenant le vaisseau de la main gauche par le fil ligature ; un aide enlève la pince et le sang monte doucement dans l'appareil. On arrête la saignée avant que le tube (A) ne soit complètement rempli ; on ferme l'effilure à la lampe, en aspirant légèrement en (T) pour empêcher le sang de couler pendant que l'on ferme ; on laisse ensuite reposer l'appareil, le tube trocart en bas.

Le caillot se forme autour de la tige (V), se rétracte autour d'elle, abandonnant ainsi les parois du tube (A) ; si cette rétraction était incomplète, il serait aisé de la compléter en aspirant un peu par la tubulure (T) : le caillot achève, de la sorte, de se détacher. Dès que la coagulation est faite, il n'y a qu'à retourner l'appareil, le sérum tombe dans le réservoir pipette, limpide et abondant. Au bout de quelques heures le caillot, achevant de se rétracter, abandonne dans le réservoir les dernières traces du sérum qu'il détient.

Les globules du sang, s'il s'en trouve d'entraînés avec le sérum, se déposent au fond de l'ampoule (M). Il ne reste plus alors, pour recueillir le sérum dans un vase stérile, qu'à briser, après l'avoir flambée, la pointe de l'effilure (E), et à chasser par cette voie le liquide, en soufflant dans la tubulure (T). On recueille ainsi une quantité maxima de sérum, 80 0/0 de la masse totale, dans des conditions d'asepsie parfaite.

Cet appareil, en usage depuis un an dans les laboratoires de l'Institut Pasteur, a donné de très bons résultats.

On peut, avec des tubes en rapport avec la grosseur de l'ani-

mal, et un peu d'habileté, saigner plusieurs fois des animaux de très petite taille, tels que rat, oiseau, etc., sans les tuer.

2° Appareil pour recueillir le sang des animaux de grande taille.

Il se compose essentiellement de :

1° Un grand flacon (A, fig. 2) de plusieurs litres, destiné à recueillir le sang ; son large goulot, latéral, est bouché au moyen d'un bouchon de caoutchouc (B) percé de trois trous qui doivent livrer passage à divers tubes en verre ;

2° Un certain nombre de cylindres en verre (O) ouverts aux deux bouts, percés d'orifices sur toute leur longueur. Le tout est placé à l'intérieur du flacon. Ces tubes sont destinés à diviser et à maintenir le caillot adhérent autour de chacun d'eux ;

3° Trois tubes en verre qui traversent le bouchon et viennent s'ouvrir à l'intérieur du flacon.

L'un (*a*) sert à l'entrée du sang, son extrémité libre est reliée par un tube de caoutchouc au trocart qui ira ponctionner la veine.

Le tube (*b*) sert simplement à l'entrée de l'air dans le flacon et au maintien de la pression atmosphérique à l'intérieur de ce dernier. L'extrémité inférieure est fortement recourbée vers le bouchon.

Le tube (*c*) sert à l'écoulement du sérum. L'extrémité inférieure se recourbe vers le bouchon ; l'extrémité libre se continue par un tube de caoutchouc (T), qui porte lui-même à l'autre bout un tube de verre (E) effilé et fermé à la lampe. On peut appliquer sur le segment de caouchouc une pince à forcipressure, qui interrompt de la sorte la communication entre les deux segments de verre.

Mode d'emploi. — L'appareil est préalablement stérilisé à l'autoclave, et le bouchon luté ensuite à la paraffine. On enfonce le trocart dans une veine de l'animal à saigner ; le sang s'écoule dans le flacon ; on laisse celui-ci s'emplir jusqu'à la moitié de sa hauteur, il ne faut pas que le niveau du liquide atteigne l'extrémité du tube à air. On laisse reposer l'appareil 12 heures environ, pour laisser au caillot le temps de se former ; puis on le fait doucement basculer en lui donnant une position inclinée, l goulot étant dirigé vers le bas ; un support (S) fixe le fla

dans cette situation. Le caillot s'est rétracté autour des cylindres (O) auxquels il adhère, et le sérum tombe au fond.

Les globules rouges entraînés ne peuvent pénétrer dans les tubes (*b*) et (*c*) à cause de leur extrémité recourbée.

Pour recueillir le sérum, on pose une pince sur le segment de caoutchouc (T); on flambe et on brise l'effilure (E), que l'on enfonce dans le récipient où l'on conservera le sérum. Cela fait, on enlève la pince et le sérum s'écoule.

Dans cette opération, une faible couche de sérum restera sur le fond du bouchon ; cette couche contiendra les globules rouges entraînés. Il faut donc : 1° que l'ouverture du tube d'écoulement soit assez voisine du fond pour que la quantité de sérum perdu soit minime ; 2° qu'elle en soit suffisamment éloignée pour que les globules du sang n'y puissent pénétrer.

Veut-on arrêter l'écoulement du sérum, on replace la pince sur le segment de caoutchouc et l'on ferme l'effilure à la lampe.

Grâce à l'extrême division du caillot dans cet appareil, la quantité de sérum fourni représente, d'après nos expériences, près du double du volume de sérum recueilli avec les procédés usuels ; c'est ainsi qu'un litre de sang donne au moins 700 centimètres cubes de sérum, au lieu de 400 à 450 centimètres cubes, chiffre habituel.

Pour recueillir dans les abattoirs le sang de bœuf que l'on ne peut saigner aseptiquement par ponction de la jugulaire (opération qui se fait d'ordinaire en recueillant le sang dans des cloches stériles), on peut, dans notre appareil, remplacer le tube porte-trocart (a) par un entonnoir stérile dans lequel on reçoit le sang. L'opération terminée, on remplace l'entonnoir par un bouchon de caouchouc stérile.

Nota. — Pour la stérilisation des appareils, il sera bon de les envelopper de papier à filtre, puis de chauffer lentement afin d'éviter la casse, et de mouiller le coton pendant l'opération.

QUELQUES OBSERVATIONS SUR LA RAGE

Par le Dr PAMPOUKIS,
Directeur de l'Institut hellénique d'Athènes.

I

Les cas de morsure par des personnes enragées sont rares. Sur 1,300 mordus traités à notre Institut, de 1894, date de la fondation, à la fin de 1898 :

	1.208	soit	92.8 0/0	avaient été mordus par des	chiens ;
	58	—	4,4	— — —	chats ;
	16	—	1,2	— —	divers animaux ;
et	18	—	1,3	avaient été contaminés par de la salive.	

Il s'est produit cependant un cas de morsure chez une personne non traitée à l'Institut. Le 29 août 1898, un enfant de 10 ans fut mordu par un chien. La rage a paru 31 jours après. Le lendemain cet enfant a mordu son père au bras droit, et est mort le surlendemain. Le père est venu se soumettre au traitement et est encore en bonne santé.

II

Nous avons observé en 1899 deux cas de rage imaginaire.

A. — Le 2 janvier, nous avons soumis au traitement un étudiant en droit, mordu par un chien enragé.

Le 6 janvier, à savoir 13 jours après la morsure, le malade a été pris de mélancolie ; il pleurait sans cause ; le lendemain il a commencé à se mordre et à mordre sa mère qui voulait l'en empêcher ; un jour après, ayant cru qu'il était pris de paralysie au pied droit, il tomba par terre et ne voulait pas se relever ; de plus, il ne voulait pas boire ; mais les jours suivants, tous ces symptômes se sont peu à peu effacés. Le traitement n'y était sûrement pour rien. Le malade était névropathe.

B. — M. S..., de 24 ans, mordu par un chien le 28 février, a été soumis au traitement le 5 mars ; deux jours après, il a senti de la difficulté à avaler ; il avait de l'hydrophobie ; il avait aussi de la tendance à mordre, mais il n'a mordu personne, ayant été

enfermé dans sa chambre ; le lendemain il se sentait mal à la tête, des fourmillements aux membres ; dans deux jours, guérison.

Nous avons vu de suite que nos deux malades n'avaient que la rage imaginaire ; en effet, l'incubation n'avait duré que 13 jours chez l'un et 7 jours chez l'autre : celle de la vraie rage est plus longue ; d'ailleurs, nous n'avons observé ni fièvre ni d'autres symptômes.

Ces deux cas sont remarquables non seulement pour la rage imaginaire, mais aussi parce que l'un des malades, dans un accès, a mordu sa mère, et que l'autre avait montré de la tendance à mordre.

III

Notre savant maître M. Roux et M. Nocard ont fait voir en 1890 que le virus rabique se trouve dans la salive des chiens 2-3 jours au moins avant que la maladie soit déclarée.

Voici, sur ce sujet, une observation assez importante : le 5 juin 1898, un chien à Volos a mordu une femme. Il a continué à se montrer bien portant pendant *huit* jours ; à ce moment, la maladie s'est déclarée, et il a mordu deux enfants qui nous ont été amenés et ont subi le traitement ; mais la femme qui avait été mordue la première, croyant qu'elle était en sûreté parce que la morsure avait eu lieu 8 jours avant l'apparition de la maladie chez le chien, n'est pas venue subir le traitement ; 69 jours après la morsure, elle a été prise de rage et est morte deux jours après.

D'après ce cas, le virus rabique peut exister dans la salive du chien 8 jours avant l'apparition de la maladie, ou du moins de ses symptômes furieux.

IV

Sur 43 enragés (non traités) morts en Grèce de 1894 à 1898 la maladie s'est déclarée :

Le premier mois après la morsure chez			4,	soit en proportion de		9,3 : 0/0.
Le deuxième	—	—	23	—	—	53,4 : 0/0.
Le troisième	—	—	16	—	—	37,2 : 0/0.

Les deux tiers environ des cas de rage se sont déclarés pendant les deux premiers mois après la morsure.

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

14me ANNÉE MARS 1900 No 3

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

De l'atrophie des ovules dans les ovaires des mammifères.

Par le Dr N. MATCHINSKY.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Dans son récent travail : « L'état actuel de la question de l'atrophie sénile », publié en 1899 dans les *Archives russes de Pathologie*, M. le professeur Metchnikoff, d'après ses recherches, et celles d'autres savants, arrive à la conclusion suivante : l'atrophie physiologique aussi bien que l'atrophie pathologique sont la conséquence de la lutte perpétuelle entre les cellules normales des tissus d'une part et les macrophages de l'autre. Les éléments sains des tissus, afin de pouvoir soutenir cette lutte contre les macrophages, sécrètent continuellement des substances qui agissent sur ces derniers comme des poisons. Mais dès qu'une cellule perd, à la suite de quelque circonstance, la faculté de sécréter cette substance protectrice, immédiatement elle est assaillie par les phagocytes et dévorée. »

Quant à l'atrophie des vieillards proprement dite, Metchnikoff exprime l'idée que, malgré l'insuffisance et même quelques contradictions dans les résultats des recherches faites jusqu'à présent, on peut cependant supposer que ce n'est pas tant l'épuisement de la faculté reproductrice des cellules qui en constitue la base, mais que « l'atrophie sénile est la conséquence de la lutte entre les éléments des tissus, lutte qui avec l'âge devient de plus en plus violente » et qui se termine par le triomphe des macrophages, lesquels eux-mêmes se transforment en tissu conjonctif et envahissent les éléments nobles de l'orga-

nisme. Pourquoi donc cette lutte se termine-t-elle fatalement à l'avantage des macrophages ?

M. Metchnikoff l'explique par la différence de la force de résistance des différents tissus de l'organisme animal aux influences nocives. Ainsi, les ovules et les cellules nerveuses sont très sensibles, tandis que les phagocytes possèdent une grande force de résistance.

Et si l'on songe que l'organisme pendant la vie est traversé par un grand nombre de poisons sécrétés, soit par les microbes auxquels il sert d'habitat normal, soit par ceux venus de dehors, on comprendra facilement que, dans la lutte pour l'existence, ce sont les éléments les plus résistants, c'est-à-dire les phagocytes, qui prennent le dessus.

Sans doute, cette manière d'interpréter les divers processus atrophiques est fort attrayante ; elle l'est non seulement au point de vue purement théorique, mais aussi, ainsi que l'admet M. Metchnikoff, au point de vue pratique, en permettant d'entrevoir la possibilité d'intervenir dans le combat des cellules. Mais les faits de cet ordre, connus jusqu'à présent, sont fort peu nombreux et leur étude systématique s'impose forcément. C'est pourquoi M. Metchnikoff m'avait proposé de m'en occuper et de commencer par étudier l'atrophie des ovules dans les ovaires des mammifères.

Il avait attiré mon attention surtout sur cette dernière question, parce que l'atrophie des ovules débute de très bonne heure et se continue pendant toute la vie de l'animal. Cette atrophie apparaît donc à une époque de la vie où il ne peut être question de troubles de la nutrition consécutifs à l'artério-sclérose. En un mot, le processus d'atrophie des ovules est le moins compliqué de toutes les atrophies.

Il nous semble inutile d'exposer l'historique complet de la question et de mentionner toutes les opinions sur ce point, car ceux qui s'intéressent particulièrement à ces études pourront trouver les indications nécessaires dans les importants travaux de *Flemming* [1] et *Schottlænder* [2].

Je citerai seulement un court résumé des travaux où il est

1. Ueber die Bildung von Richtungsfiguren in Sangethiereiern beim Untergang Graafscher Follikel. (*Arch. für Anatomie und Entwickelungsgesch.*, 1885).

2. Ueber den Graafschen Follikel, sein Schicksal bei Mensch-und Saugethiereiern. (*Arch. für mikr. Anatomie*, Bd. 41, 1893.)

question directement ou indirectement des phénomènes phagocytaires dans l'atrophie des ovules.

D'après les recherches de *Brunn*[1], *Strahl*[2], *Ruge*[3], *Henneguy*[1] et *Mingazzini*[5], l'atrophie des ovules chez les oiseaux, les amphibies et les reptiles consiste en ce que le vitellus subit une segmentation irrégulière, et en même temps la couche de l'épithélium folliculaire s'épaissit, les cellules épithéliales pénètrent avec les leucocytes dans le jaune d'œuf, l'absorbent et se transforment ensuite en tissu conjonctif qui se substitue au follicule.

D'après *Mingazzini*, le vitellus peut être sujet à un autre genre de transformation, et notamment, il peut quelquefois tout simplement se liquéfier. Il faut en outre remarquer, et Henneguy insiste tout particulièrement sur ce point, que chez les animaux sus-mentionnés les phagocytes pénètrent dans le jaune d'œuf dès le début de l'atrophie; ils séparent les débris du jaune fragmenté, les dévorent et les digèrent.

Quant à l'atrophie des ovules dans les ovaires des mammifères, il existe plusieurs travaux importants, ainsi que ceux de *Schottländer* (l. c.), *Flemming* (l. c.), *Janosik*[6], *Paladino*[7], *Henneguy* (l. c.) et d'autres.

D'après ces auteurs, la forme la plus fréquente de la dégénérescence des ovules est la fragmentation. Pendant ce phénomène, on observe dans l'ovule à peu près les mêmes changements que pendant son développement normal après la fécondation. Il n'y a qu'une différence : pendant le processus atrophique le vitellus se divise en segments non réguliers, et même cette segmentation cesse bientôt. *Henneguy* appelle ce genre d'atrophie « le développement parthénogénétique ». D'après lui il se produit ici les mêmes phénomènes que chez certaines plantes et

1. Die Ruckbildung nichtausgestossener Eierstockeier bei den Vogeln. (*Beitr. z. Anat. und Embryologie als Festgabe...* Bonn, 1882.)

2. Die Ruckbildung reifer Eeirstockeier am ovarium von Lacerta agilis (*Verhandl. die Anat. Ges.*, auf VI, vers. 1892.)

3. Vorgange am Eifollikel der Wirbelthiere. (*Morphol. Jahrbüch*, Bd. 15, 1889.)

4. Recherches sur l'atrésie des follicules de Graaf. (*Journal de l'Anatomie et de la Physiologie*, 1994.)

5. Corpi lutei veri e falsi dei Rettili. (*Ricerche fatte nel Labor. di Anat. normale di R. Universita di Roma*, t. III, 1893.)

6. Die Atrophie der Follikel und ein seltsames Verhalten der Eizellen. (*Arch. f. mikr. Anat.* Bd. 48, 1896.)

7. Ulteriori ricerche sulla distruzione e rinovamento continui del paenchima ovarico dei Mammiferi, Napoli, 1887.

certains animaux, chez lesquels la maturité est hâtée par l'insuffisance de la nutrition, c'est-à-dire que l'œuf mûrit prématurément, et, après avoir exécuté les premières phases de la segmentation, périt.

Outre ce genre de dégénérescence, on en a décrit aussi d'autres, par exemple, la dégénérescence albuminoïde, graisseuse, hyaline, ainsi que les formes mixtes.

L'épithélium folliculaire est sujet aussi à toutes sortes de dégénérescences (chromatolyse, dégénérescence graisseuse, hyaline, etc.). Quant au point où commence la dégénérescence, on n'est pas d'accord. Pendant que *Henneguy* suppose que l'épithélium folliculaire sert d'aliment à l'œuf, et que c'est seulement *après* la dégénérescence de l'épithélium que survient celle de l'œuf, *Schottländer*[1] dit au contraire que « der Zustand des Follikelepithels ist nur bedingt verwerthbar », et que l'épithélium peut conserver son état normal alors même que l'œuf présente des traces évidentes d'atrophie.

Le fait que l'œuf qui s'atrophie n'est pas simplement résorbé, mais qu'il est détruit par les cellules avoisinantes, — ce fait est connu depuis longtemps. *Pflüger*[2] avait déjà remarqué que les cellules de la couche granuleuse (Nagelzellen) envoient des prolongements dans l'intérieur de l'œuf, qu'ensuite le vitellus se détache de la zone *pellucide*, se liquéfie dans certaines parties, et se désagrège dans d'autres.

Cette remarque de *Pflüger* a été ensuite confirmée et complétée par plusieurs observateurs (*H. Virchow*[3], *Nagel*[4], *Petitpierre*[5]). Quelques-uns, comme par exemple *Janosik*, *Schottländer* et *Henneguy*, supposent que les cellules migratrices qui dérivent de la couche granuleuse peuvent aussi prendre part à la destruction des restes de l'œuf désorganisé. Cette transformation des cellules de la couche granuleuse en leucocytes a été déjà observée par *Schulin*[6]. Des travaux que nous venons de citer il résulte que chez les mammifères, à l'encontre de ce que l'on

1. Beitrag zur Kenntniss der Follikelatresie. (*Arch. für mikr. Anatomie*. Bd. 37, 1891.)
2. Ueber die Eierstöcke der Säugethiere und des Menschen. Leipzig, 1863.
3. Durchtreten von Granulosazellen durch die Zona pellucida des Säugethiereies. (*Arch für mikr. Anat.*, Bd. 24, 1887.)
4. Das Menschliche Ei. (*Arch. f. mikr. Anat.*, Bd. 81.)
5. Ueber die Eindringen von Granulosazellen durch die Zona pellucida den menschl. Eiern, Bd. 35.)
6. Zur morphologie des Ovariums. (*Arch. f. mikr. Anat.*, Bd. 19, 1881.)

observe chez d'autres vertébrés, les phénomènes de la phagocytose deviennent évidents seulement à la période plus avancée de l'atrophie de l'œuf, et les cellules de la couche granuleuse, de même que les leucocytes, détruisent seulement les restes de l'œuf déjà désorganisé ; *Henneguy* dit même : « Très souvent l'ovule s'atrophie sans que les éléments cellulaires prennent part au processus de régression. »

Le but de mon travail ne consiste pas à démontrer l'existence des phénomènes phagocytaires, qui sont déjà un fait avéré, mais j'ai cherché : 1° à voir si vraiment l'atrophie des ovules des mammifères se distingue notablement de ce même processus chez d'autres vertébrés ; 2° j'ai voulu, en outre, approfondir davantage l'étude de la manifestation de la phagocytose dans ces cas particuliers, c'est-à-dire voir de quelle façon ces phagocytes dévorent les éléments de l'œuf.

II

Je me suis servi pour mes recherches des ovaires des animaux habituels aux laboratoires, c'est-à-dire des cobayes, des lapins, des chiens et des chats [1]. Les morceaux d'organes d'un animal, qui venait d'être sacrifié, ou bien l'organe tout entier étaient plongés pendant 24 heures dans la liqueur forte de Flemming ; ensuite je les mettais dans la paraffine, et j'en faisais des séries de coupes. Il est indispensable, afin de bien étudier l'ovule et le follicule, de faire une série de coupes dans tous les plans de l'organe. Pour colorer les préparations, je les laissais pendant 24 heures dans une solution aqueuse de safranine saturée, et ensuite je les lavais dans l'alcool acidulé, ou bien je les traitais par l'acide picrique et par l'alcool. Je trouve que ce procédé de préparation convient le mieux à l'étude des processus d'atrophie : il permet de bien distinguer les éléments de la dégénérescence de ceux qui sont sains.

Quelquefois, au lieu de me servir de la liqueur de Flemming,

1. En outre j'ai eu l'occasion d'examiner deux ovaires d'une femme qui lui ont été enlevés à la suite d'une opération. J'avais examiné aussi les ovaires des poules, des grenouilles et des tritons. Mais ces études n'étant pas terminées, je les laisse de côté.

je faisais les préparations avec celle de *Hermann*, ou bien les préparations fixées par la liqueur de Flemming étaient colorées avec de l'éosine additionnée de bleu de méthylène, ou bien encore avec de la safranine et du picro-carmin d'indigo. Mais tous ces procédés ne valent pas le premier.

Les ovules atrophiés sont déjà assez nombreux dans les ovaires mêmes des femelles toutes jeunes, mais pubères; on peut donc étudier le processus d'atrophie sur les ovaires de tout animal sain. Cependant, il est plus avantageux de faire ces études sur les ovaires des animaux placés dans quelque condition anormale, ou même sur les ovaires des animaux malades, et cela parce que : 1° nous pouvons trouver, chez ces animaux, un très grand nombre d'ovules atrophiés, et dans les différentes phases de l'atrophie, et 2° parce que cette atrophie pathologique, ainsi que j'ai pu le constater pendant les comparaisons que j'ai faites des follicules des animaux sains et malades, ne diffère en rien de l'atrophie physiologique.

Tout le monde sait que souvent les animaux en captivité ne se reproduisent pas; cela résulte de l'atrophie d'un grand nombre d'ovules, ainsi que l'avait démontré Mingazzini. On peut en déduire que les ovules sont extrêmement sensibles à toute influence nocive pour l'organisme entier. Mingazzini avait trouvé, dans les ovaires des reptiles vivant en captivité, un nombre beaucoup plus considérable de follicules atrophiés, que dans les ovaires des mêmes animaux en liberté, et dans les mêmes saisons. M. Metchnikoff donna l'explication de ces faits par ses études sur les poules, auxquelles il avait préalablement injecté de la toxine du tétanos.

A l'examen des différents organes de ces poules, il constata que, tandis que la quantité de toxine qui y est renfermée est en rapport avec la quantité de sang qui s'y trouvait, les testicules des mâles et les ovaires de femelles en renfermaient, au contraire, une dose si forte que l'injection faite aux souris de l'émulsion préparée avec ces organes produisait un tétanos mortel. Et ceci permet de supposer *a priori* que les autres toxines doivent agir à l'instar de la toxine tétanique.

Par conséquent, si l'on injecte aux animaux des bactéries qui sécrètent ces toxines, ou bien si l'infection se produit naturellement, le résultat au point de vue qui nous intéresse doit être

le même. Et si nous trouvons une certaine quantité d'ovules atrophiés dans les ovaires mêmes des animaux sains, cette atrophie doit provenir aussi de l'intoxication par les toxines sécrétées par des bactéries peu nombreuses qui ont fortuitement pénétré dans l'organisme. Ces toxines, ayant été en petite dose, ne provoquent pas de troubles généraux, mais peuvent cependant, en s'accumulant dans les ovaires, détruire un bon nombre d'ovules. En effet, ce que nous trouvons dans les préparations histologiques des ovaires est parfaitement confirmé par les expériences susmentionnées de M. Metchnikoff. Même à la suite de l'injection hypodermique aux animaux de microorganismes sécrétant seulement des toxines faibles, par exemple de la levure pathogène [1] (Blastomyces de Curtis), on peut déjà observer de notables modifications dans les ovaires. Ces modifications consistent dans l'atrophie d'un grand nombre d'ovules. .

J'ai trouvé des modifications beaucoup plus considérables dans les ovaires des cobayes auxquels on avait fait l'injection de toxine diphtérique. L'animal recevait une seule injection non mortelle (1/300, 1/200 de c. c.). Il était sacrifié du 2e au 5e jour après l'injection, et, à l'examen, je trouvai déjà presque la moitié des ovules dans différentes phases de dégénérescence, avec prédominance de celle du début.

Quant aux phénomènes que l'on observe, au point de vue dont nous nous occupons, à la suite d'une intoxication chronique, je n'en ai eu malheureusement qu'un seul cas. J'ai pu examiner les ovaires d'une femelle de cobaye morte un mois après une double injection de toxine diphtérique de 1/300 et 1/150 c. c. Elle a eu de la paralysie des extrémités. Les ovaires étaient très atrophiés : ils étaient presque de moitié plus petits qu'à l'état normal. A l'examen microscopique, j'ai pu trouver dans chacun des ovaires à peine trois à quatre ovules sains.

La toxine tétanique produit, il me semble, les mêmes effets que la toxine diphtérique. J'en juge d'après l'examen des ovaires d'un cobaye auquel on avait injecté une dose mortelle, et qui a été tué trois jours après l'injection.

1. J'ai examiné les ovaires de deux cobayes et d'une poule, auxquels M. le Dr Vlaeff, pour ses expériences personnelles, avait fait ce genre d'injections. Grâce à l'amabilité de ce confrère, j'ai eu aussi à ma disposition les ovaires des animaux auxquels on avait fait l'ablation de la rate. Je parlerai plus loin du résultat de mes observations.

Les effets des poisons inorganiques sont les mêmes que ceux des toxines. Je m'en suis convaincu en examinant les ovaires d'un cobaye et d'une lapine empoisonnées avec de l'arsenic. J'ai trouvé dans les ovaires de ces animaux presque les mêmes lésions que dans l'intoxication avec une dose non mortelle de toxine diphtérique.

L'atrophie des ovules peut être provoquée non seulement par les différentes intoxications, mais aussi par tout trouble organique favorisant la pénétration de substances toxiques dans la circulation générale.

A l'appui de cette thèse, je peux citer les observations faites sur les ovaires des animaux privés de leur rate.

J'ai eu à ma disposition les ovaires d'une jeune chienne tuée 6 mois après l'ablation de la rate, ainsi que les ovaires d'une chatte de 3 mois et demi, sacrifiée 2 mois après l'opération.

A l'autopsie, on avait constaté, chez les deux animaux, de grands changements dans le foie, les ganglions lymphatiques, la glande thyroïde, etc.

Quant aux ovaires des deux animaux, on y trouvait une intense atrophie des ovules. Ce qui fait supposer que les animaux privés de leur rate sont privés en même temps du filtre qui, à l'état normal, s'empare des bactéries et des toxines; c'est pourquoi les toxines circulent librement dans le sang, s'accumulent dans les ovaires, et par conséquent dans les ovules.

III

Je passe maintenant à la description des phénomènes observés dans les ovules pendant l'évolution atrophique.

Je dois dire tout d'abord que, même chez les mammifères, il n'y a pas de règle générale pour la dégénérescence. Chaque ovule ne périt pas à sa façon, mais il existe néanmoins certaines particularités, selon l'espèce de l'animal, l'âge de l'œuf, et sans doute, selon d'autres circonstances qui sont difficiles à percevoir. Cela a été constaté aussi par d'autres observateurs, notamment par Schottländer, qui attribue précisément à ce fait la divergence des savants sur les phénomènes de l'atrophie des

ovules. Henneguy dit que sur la même coupe on peut observer les différentes formes de la dégénérescence. et il ajoute que « différents processus dégénératifs peuvent se montrer associés dans un même ovule et dans un même follicule ».

Je commencerai par décrire ce qui se passe dans l'atrophie des ovules de chienne, car 1° chez cet animal, on peut suivre toute la marche du processus de régression, et 2° les phénomènes phagocytaires se manifestent ici d'une façon très évidente. Ce qui contribue à faciliter l'étude de cette dégénérescence, c'est que les ovules des chiennes subissent de préférence la dégénérescence graisseuse.

La graisse, comme on le sait, est très bien colorée en noir par l'acide osmique. Par conséquent, lorsque les cellules avoisinant l'ovule absorberont ses débris transformés en graisse, on verra très bien, à l'intérieur de ces cellules, des gouttelettes noires colorées par l'acide osmique. Si nous examinons à l'état normal le follicule et son ovule arrivés à cette période du développement où la cavité de l'ovisac est déjà remplie de liquide folliculaire, nous verrons que le vitellus est parfaitement transparent ou à peine granuleux, que la vésicule germinatrice a la forme globulaire, et renferme un réseau chromatique très visible : les cellules de la couche granuleuse sont régulièrement cylindriques ou bien piriformes, avec des prolongements dirigés vers la zone pellucide ; quelques-unes de ces cellules sont déjà à l'état de segmentation. A cette période, ni dans l'ovule, ni dans les cellules de la couche granuleuse, ni dans l'épithélium folliculaire, il n'est possible de déceler la présence de graisse. Mais, dès que l'ovule commence à dégénérer, immédiatement on voit s'accumuler dans le vitellus des gouttelettes de graisse dont la quantité s'accroît si rapidement que, même à une époque très peu avancée, quand le vitellus a conservé encore tous ses contours, il est déjà tout noir, car les gouttelettes graisseuses isolées se sont fusionnées.

Les parois de la vésicule germinative dès la première phase s'affaissent, et il est impossible de suivre le sort ultérieur de la vésicule, parce qu'elle devient complètement invisible au milieu de la masse de graisse. La zone pellucide, qui avait au début l'aspect homogène ou bien légèrement filamenteux, paraît à la fin être percée de pores. Quant aux cellules de la couche granuleuse,

elles présentent dès le commencement de la dégénérescence les phénomènes suivants : pendant que certaines d'entre elles restent normales, d'autres se gonflent, s'arrondissent et se remplissent de petites gouttelettes de graisse (fig. 1, pl. II). Sur les coupes réussies, on peut voir qùe ce sont précisément ces dernières cellules qui pénètrent par leurs fins prolongements jusqu'à l'ovule (fig. 2), et parfois on peut même apercevoir qu'une telle cellule avait pratiqué de larges perforations dans l'enveloppe de l'ovule. Dans ces cas, une partie du protoplasma se trouve plongée dans le vitellus, tandis que l'autre reste dehors. Même ce tableau montre déjà suffisamment que les cellules de la couche granuleuse ont ici pour fonction de dévorer l'ovule dégénéré. En outre, à mesure que le processus s'avance, le nombre des cellules de la couche granuleuse autour de l'ovule diminue de plus en plus. Mais en revanche, dans le liquide folliculaire et dans le tissu environnant le follicule, nous voyons un grand nombre de cellules de différentes grosseurs remplies de graisse.

Les unes par leur aspect extérieur ressemblent aux leucocytes mononucléaires, tandis que d'autres rappellent les cellules de la couche granuleuse; on rencontre aussi des formes intermédiaires. Il n'est pas douteux que toutes ces cellules, ou au moins le plus grand nombre sont celles de la couche granuleuse.

Après s'être repues de graisse, elles s'en vont; quelques-unes pénètrent peut-être dans les vaisseaux lymphatiques, d'autres restent sur place et se transforment en cellules fusiformes.

Lorsque l'ovule, en train d'être dévoré par les phagocytes, diminue, il se détache de son enveloppe qui, dans la plupart des cas, s'affaisse aussi.

Dans cet état de la membrane, il devient incommode aux dernières cellules de la couche granuleuse, et peut-être aussi aux leucocytes [1] arrivés du dehors, de se procurer de la graisse de la même façon que les premières cellules : c'est pourquoi elles pénètrent tout simplement à travers la zone pellucide dans l'intérieur de l'ovule (fig. 3), l'absorbent et finissent par dévorer la membrane vitelline elle-même. Après avoir terminé leur tâche, ces cellules restent sur place, deviennent fusiformes

1. Je dois ajouter que toutes ces cellules ressemblant aux leucocytes sont mononucléaires, ce qui est tout naturel, car ce sont seulement les leucocytes mononucléaires qui prennent part à la destruction des tissus.

et comblent le vide qui s'était formé après la destruction du follicule. Quelquefois les phagocytes commencent à se transformer en cellules fusiformes avant la désorganisation complète de l'ovule : ainsi j'ai pu voir à l'intérieur de l'ovule, à côté de grandes cellules rondes remplies de graisse, des cellules fusiformes. D'autres fois il m'était arrivé de voir le contraire, c'est-à-dire, la zone pellucide restée intacte, mais aussi ni à l'intérieur ni au dehors on ne voit de phagocytes ; dans ces cas il paraîtrait que le travail est resté inachevé faute de travailleurs.

Sur les ovaires des chiennes, je n'ai pas pu remarquer si le changement de l'épithélium folliculaire précède les phénomènes de régression de l'ovule ; il semble qu'ici le processus dans l'épithélium commence simultanément avec celui de l'ovule lui-même. Il consiste en ce que les cellules s'écartent les unes des autres, émettent des prolongements par lesquels elles s'anastomosent, et forment ainsi un réseau irrégulier, comme une sorte de plasmode.

Le nombre de cellules de ce réseau diminue progressivement, de sorte que, dans les follicules à la période avancée de l'atrophie, on ne voit plus de cellules épithéliales. Que deviennent-elles ? Périssent-elles aussi, ou bien se transforment-elles peu à peu en phagocytes et prennent-elles part aussi à la démolition de l'ovule ? Il m'est impossible de résoudre ces questions d'après les préparations que j'avais à ma disposition.

Ce que nous venons de décrire concerne l'atrophie des ovules adultes, mais cette même évolution se rencontre aussi chez les ovules et les follicules de tout âge : partout et toujours l'atrophie s'exprime par la dégénérescence graisseuse, et on voit autour des follicules dégénérés l'accumulation des cellules remplies de graisse.

Chez les chattes, l'atrophie des ovules s'effectue un peu autrement que chez les chiennes, et les phénomènes phagocytaires secondaires se manifestent ici avec beaucoup moins de netteté. Dans la plupart des cas, cependant, c'est aussi la dégénérescence[1] du vitellus et l'affaissement de la vésicule germinative qui ont lieu. Quelquefois le vitellus se fragmente irrégulièrement, mais ces phénomènes ne sont pas précédés de figures de

1. La graisse ici se distingue probablement par quelque particularité, car elle ne dépose pas sous forme habituelle de petits granules sphériques, mais on en voit sous forme de masses irrégulières, ayant l'aspect du charbon finement pulvérisé.

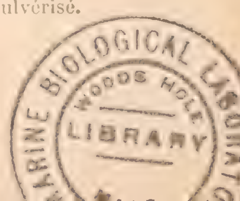




Fig. 8.



Fig. 9.

La phase du début et celle de la fin de la dégénérescence graisseuse de l'ovule de chatte, avec formation autour de lui d'une plasmodie par les cellules de la couche granuleuse et de l'épithélium folliculaire. Fixation par le liquide de Flemming, coloration par la safranine.

segmentation, ni de l'apparition du corpuscule polaire autour duquel se concentre le processus, ainsi que cela se voit chez les cobayes.

Parallèlement à l'atrophie de l'ovule se produisent aussi des modifications dans la couche granuleuse et dans l'épithélium folliculaire. Ces modifications consistent en une mobilisation des cellules, leur écartement les unes des autres, ce qui amène leur disposition irrégulière (fig. 8); on observe en même temps l'émission de prolongement, leurs anastomoses, et la formation d'un réseau plasmodique (fig. 9.)

Plus tard, l'ovule, sans perdre sa membrane, se ratatine à



Fig. 10.
Coupe d'ovaire d'une cobaye empoisonnée par la toxine diphtérique. Ovule jeune en état de segmentation assez régulière, coloration par la safranine.

la suite de la diminution du vitellus, et les mailles du réseau susmentionné se rétrécissent de plus en plus autour de l'ovule, et en même temps les noyaux des cellules perdent leur chromatine.

Pendant quelque temps, il ne reste du follicule que la zone pellucide, et c'est à cette époque seulement qu'on peut voir en dedans et en dehors de cette membrane quelques cellules rem-

plies de graisse et qui ressemblent aux leucocytes. De quelle façon s'effectue donc ici l'absorption de l'ovule?

Je n'ai pas pu suivre les détails de ce processus, mais il semblerait que l'absorption se fait avec le concours du plasmode dont nous avons parlé plus haut, et qui se forme des cellules de



Fig. 11.

Une autre coupe du même ovaire. Débris d'ovule sous forme de sphères irrégulières restées non dévorées par les phagocytes au milieu d'un tissu conjonctif organisé.

la couche granuleuse et de l'épithélium folliculaire. Les follicules pendant le processus de l'atrophie sont entourés de grands amas de cellules renfermant des gouttelettes de graisse, et qui ressemblent à celles des corps jaunes (corpus lutei). On peut voir de semblables cellules aussi dans le follicule même, et dans le voisinage immédiat de l'ovule qui s'atrophie.

Chez les femelles de cobayes (fig. 10 et 11), de rats et de lapins, on observe le plus souvent deux genres d'atrophie selon l'âge de l'ovule. Dans les ovules jeunes les choses se passent de la façon suivante : le vitellus devient trouble, se divise en petites masses irrégulières, diminue de volume, comme s'il fondait, de sorte que la zone pellucide se plisse et enfin reste seule, ayant l'aspect d'un sac plié en deux. Souvent on voit dans ce petit sac et tout

autour des cellules remplies de granules graisseux. Ces cellules ressemblent aux leucocytes. Probablement ces cellules s'occupent de la destruction des débris de l'ovule, et se transforment ensuite en cellules fusiformes qui remplissent l'espace laissé par l'ovule détruit.

A mesure que l'atrophie de l'ovule s'avance, le nombre de cellules épithéliales qui l'entourent diminue, et puisqu'on constate dans le voisinage une quantité considérable de cellules rappelant par leur aspect les leucocytes mononucléaires, nous sommes autorisés à supposer qu'il se produit ici le même processus que celui de l'atrophie des ovules chez les chiennes, c'est-à-dire que les cellules épithéliales dévorent le vitellus et puis s'en vont.

Dans les ovules à la période voisine de la maturation, on observe le plus souvent une fragmentation préalable. Je ne décris pas le mode d'après lequel cette fragmentation a lieu, fragmentation qui est la manifestation de la maturité prématurée, car ce phénomène est décrit avec tous ses détails par Flemming, Janosik et Henneguy.

A l'époque où l'ovule se divise en fragments, la couche granuleuse est divisée, soit en cellules isolées, soit en amas de cellules réunies entre elles. et tout à fait semblables aux cellules géantes. On trouve aussi des mononucléaires isolés en quantité variable. et provenant probablement de la couche granuleuse.

Il n'est pas douteux, et cela a été confirmé par d'autres observateurs, que tous ces éléments prennent une part plus ou moins active à la destruction de débris de l'œuf. On peut même très bien suivre ce processus destructif.

Ainsi que représente la fig. 7, cela se passe précisément de la même façon qu'avait décrit M. Metchnikoff[1] en relatant le mode d'après lequel les leucocytes dévorent les globules rouges du sang, lorsqu'on injecte du sang d'oie dans la cavité péritonéale d'un cobaye : un phagocyte s'accroche à un fragment et le dévore peu à peu en commençant par sa surface extérieure. Pendant que la destruction de l'ovule s'effectue, la cavité folliculaire, à la suite de l'absorption du liquide, et grâce à l'élasticité des parties environnantes, s'affaisse de plus en plus, de sorte qu'il

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1899, n° 10.

ne reste à la fin du processus qu'un petit vide qui est comblé aussi par les phagocytes [1].

La fragmentation n'est pas le seul mode d'atrophie des ovules adultes ; ils peuvent s'atrophier de la même façon que les jeunes ovules ; ces derniers, d'autre part, peuvent aussi se fragmenter préalablement avant de subir des modifications ultérieures.

IV

Au commencement de cet article j'ai cité l'opinion de M. Metchnikoff sur la cause pour laquelle les ovules s'atrophient même chez des animaux sains : d'après lui, les ovules absorbent sans choix les matériaux nutritifs et avec eux les substances toxiques qui avaient pénétré accidentellement dans l'organisme. Ces substances toxiques rendent les ovules malades : ils perdent la faculté de sécréter la substance protectrice contre les macrophages. Cette opinion n'explique pas, cependant, pourquoi seulement un certain nombre d'ovules s'atrophie à la fois.

J'ai dit plus haut que, même chez un animal empoisonné par des toxines injectées, on trouve toujours une certaine quantité d'ovules sains.

D'autre part on sait que l'atrophie frappe les ovules de tout âge. La substance toxique diluée dans les liquides de l'organisme arrive à tous les ovules en même quantité : les conditions de la résistance étant les mêmes, il faut donc chercher la cause de la destruction d'un nombre limité d'ovules dans les processus vitaux des cellules elles-mêmes, et notamment dans l'exercice des fonctions digestives. D'ailleurs, Metchnikoff relate le fait suivant (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1899, p. 755) : si l'on injecte dans la cavité péritonéale d'un cobaye une trop grande quantité de sang d'oie, une partie seulement des globules rouges est dévorée par les phagocytes, et le reste demeure assez longtemps intact. Évidemment les phagocytes qui se trouvaient dans la cavité péritonéale dévorèrent autant de globules rouges qu'ils purent, et, comme leur digestion se fait assez lentement, ils dédaignèrent le reste.

1. Des fois, bien que rarement, on peut voir les débris de l'œuf au milieu du tissu conjonctif déjà organisé (fig. 11). Cela fait supposer que la phagocytose, à la suite de quelque circonstance, n'a pas été suffisante.

Rappelons-nous maintenant ce qui se passe pendant les premières phases de l'atrophie des ovules chez les chiennes : il n'y a qu'un certain nombre de cellules de la couche granuleuse qui soient remplies de granules graisseux; d'autres en sont dépourvues. Cela prouve que les cellules ne sont pas occupées toutes à la fois à dévorer l'ovule, et que c'est seulement celles qui en ont besoin qui prennent part au repas. En se servant maintenant de ces faits pour comprendre pourquoi un nombre d'ovules relativement restreint s'atrophie à la fois, nous pouvons admettre qu'au moment où les substances toxiques circulaient à travers l'organisme, il n'y avait que ce certain nombre d'ovules qui éprouvait le besoin d'absorber des aliments, et qu'avec ces dernières il absorbait aussi les substances toxiques. Dans l'organisme sain, ces substances sont en petite quantité et elles séjournent peu de temps : aussi voit-on peu d'ovules s'atrophier à la fois.

Cela ne nous explique pas, cependant, pourquoi ce sont précisément les ovules qui sont le plus sensibles aux poisons. Malgré que ce fait a une grande importance pour l'organisme et qu'il est inévitable, nous pouvons le déduire de cet autre fait : la nature a doté chaque ovaire d'une énorme qnantité d'ovules, au lieu de rendre ces derniers plus résistants.

CONCLUSIONS

1) L'atrophie des ovules chez les animaux sains, et qu'on pourrait appeler « atrophie physiologique », ne diffère en rien de celle qui est provoquée artificiellement par l'injection de toxines ou d'autres poisons. La différence n'existe que dans le nombre des ovules atrophiés.

2) L'atrophie de l'ovule est le plus souvent précédée de modifications des cellules de la granuleuse, qui changent leur position ordinaire, se mobilisent et se transforment en un réseau plasmodique. Ce processus doit être envisagé comme un phénomène de phagocytose primaire dans lequel l'ovule, probablement atteint par quelque intoxication, est attaqué à la fois par toute la masse des cellules de la granuleuse. Cette formation de plasmode est non seulement l'acte le plus précoce dans l'atrophie de l'ovule, mais aussi un phénomène qui s'observe chez tous les mammifères que j'ai pu étudier.

3) Les modifications visibles de l'ovule même présentent, au contraire, beaucoup de variations dans la série des mammifères. Tandis que chez les uns l'ovule se fragmente en plusieurs segments, chez d'autres il reste uni. La dégénérescence graissense présente un autre phénomène limité à quelques espèces seulement. On n'a pas le droit, par conséquent, de lui attribuer une importance fondamentale.

4) L'ovule fragmenté ou simplement dégénéré est ensuite en totalité ou, le plus souvent, en partie dévoré par des mononucléaires, provenant du plasmodium de la granuleuse. Cet acte constitue la phagocytose secondaire, qui présente une variabilité plus ou moins grande, suivant les cas.

5) La cause d'après laquelle les substances toxiques n'agissent pas en même temps sur tous les ovules de l'ovaire réside dans les propriétés vitales des ovules.

6) En résumant l'histoire de l'atrophie de l'ovule des mammifères, on peut se la représenter comme un processus cellulaire consistant dans l'affaiblissement de l'ovule et dans l'agression des cellules de la granuleuse qui enveloppent l'ovule par leur plasmodium, pénètrent à travers de la zone pellucide, et s'incorporent l'œuf ou ses débris. Finalement les macrophages de la granuleuse se transforment en tissu conjonctif qui remplit le follicule.

En terminant mon travail, je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance à M. Metchnikoff qui a bien voulu me guider dans mes recherches.

EXPLICATION DES PLANCHES II ET III

Fig. 1. — Ovaire d'une chienne à laquelle on avait fait l'ablation de la rate. Ovisac avec son ovule à l'état de la dégénérescence graisseuse. Quelques cellules de la couche granuleuse renferment des granules graisseux. Dans le liquide folliculaire, entre les cellules de l'épithélium transformé et dans le tissu conjonctif environnant (*theca folliculi*), on voit des cellules renfermant des gouttelettes de graisse; ce sont les formes intermédiaires entre les cellules de la couche granuleuse et les leucocytes.

Fig. 2. — Coupe d'ovaire d'une chienne à laquelle on avait fait l'ablation

de la rate, une partie d'ovule à l'état de la dégénérescence graisseuse. Quelques cellules de la couche granuleuse pénètrent par leurs fins prolongements à travers la zone pellucide jusqu'au vitellus.

Fig. 3. — Coupe d'ovaire d'une chienne à laquelle on avait fait l'ablation de la rate. Une des phases avancées de la dégénérescence. Un certain nombre de cellules de la couche granuleuse a traversé la zone pellucide et se trouve à l'intérieur de l'ovule; ces cellules sont remplies de graisse; d'autres cellules de la couche granuleuse sont autour de l'ovule désorganisé, et ce sont soit des cellules renfermant la graisse et ressemblant aux leucocytes, soit des cellules fusiformes remplies aussi de graisse.

Fig. 4. — Coupe d'ovaire d'une lapine empoisonnée avec de l'arsenic. Ovule normal, à la période proche de sa maturité. Disposition régulière des cellules de la couche granuleuse; quelques-unes sont à la période de segmentation.

Fig. 5. — Une autre place de la même coupe. Ovule à la première phase de la dégénérescence. On voit dans l'ovule le fuseau dirigeant; les cellules de la couche granuleuse ne sont plus disposées régulièrement, leurs contours en sont effacés; les noyaux par suite de la dissolution de la chromatine sont pâles.

Fig. 6. — Coupe d'ovaire d'une cobaye tuée après l'injection de levure (Blastomyces Curtis). Ovule entouré de restes de la couche granuleuse nageant librement dans le liquide folliculaire. Ces restes de la couche granuleuse tantôt sous forme de cellules isolées (*a*), tantôt fusionnés sous forme de cellules géantes (*b*). On voit en outre quelques globules rouges du sang. L'épithélium folliculaire, qu'on ne voit que d'un côté seulement (*d*), est à l'état de dégénérescence : ce sont, pour la plupart, des cellules fusiformes réunies par leurs prolongements. Cette préparation est colorée par l'éosine et le bleu de méthylène.

Fig. 7. — Coupe d'ovaire d'une rate blanche. Ovisac avec ovule à l'état de segmentation dont on voit quelques débris (*a*); à côté de ces débris se trouvent isolées, ou bien fusionnées sous forme de cellules géantes, des cellules ressemblant tantôt aux cellules de la couche granuleuse, tantôt aux leucocytes. Ces cellules par place (*b*) s'accrochent aux débris de l'œuf. La préparation est fixée par le liquide d'Hermann et colorée avec de la safranine. Dessiné avec l'ocul. à l'immersion à l'huile, de Zeiss 1/13, et l'object. n° 4.

Fig. 8 *et* 9 (dans le texte). — La phase du début et celle de la fin de la dégénérescence graisseuse de l'ovule de chatte, avec formation autour de lui d'une plasmodie par les cellules de la couche granuleuse et de l'épithélium folliculaire. Fixation par le liquide de Flemming, coloration par la safranine.

Fig. 10. — Coupe d'ovaire d'une cobaye empoisonnée par la toxine diphtéritique. Ovule jeune en état de segmentation assez régulière, coloration par la safranine.

Fig. 11. — Une autre coupe du même ovaire. Débris d'ovule sous forme de sphères irrégulières restées non dévorées par les phagocytes au milieu d'un tissu conjonctif organisé.

ÉPIDÉMIE DE PESTE AU VILLAGE DE KOLOBOVKA

Par le professeur V. TCHISTOWITCH.

Le village de Kolobovka, où a éclaté une épidémie de peste pendant la seconde moitié de l'été 1899, se trouve dans le département d'Astrakan, à 8 verstes de la ville de *Tsarev*. Il est situé sur le bord élevé de la petite rivière *Ahtouba*, un des bras du Volga, et entouré de steppes. Il y a dans ce village 3,500 habitants, tous Russes, qui sont pour la plupart cultivateurs de céréales et éleveurs de moutons. En été, la plus grande partie de la population se transporte habituellement dans les steppes, assez loin du village, pour les travaux des champs, et s'installe dans des baraques provisoires. Il en a été de même l'été dernier, de sorte qu'il ne resta au village que 550 personnes, trop vieilles ou trop jeunes pour travailler aux champs. Le premier cas de peste se manifesta le 16/28 juillet. *Marie Semakina*, 35 ans, sourde-muette, non mariée, habitant dans une des baraques de la steppe, tomba malade. Elle eut de la fièvre, des vomissements, de la toux avec expectorations sanguinolentes. Elle fut transportée au village où elle mourut le 21 juillet /2 août. A son enterrement vinrent ses plus proches parents. Deux d'entre eux tombent malades le 22 juillet / 3 août, présentant les mêmes symptômes, et meurent 3 jours après. Ensuite, jusqu'au 9/21 août, il y eut toute une série de cas, surtout parmi les personnes en contact direct avec les malades. Il y eut en tout 24 *cas* de peste, dont 23 *mortels*. Les symptômes furent presque toujours les mêmes et la forme suraiguë.

Habituellement la mort survenait le deuxième, le troisième ou le quatrième jour au plus tard. La maladie débutait par un frisson, la température montait jusqu'à 40° et plus. Les malades se plaignaient de céphalalgie, de douleurs dans la poitrine et de faiblesse générale. Il y eut assez souvent des vomissements. Sur 24 malades, 17 avaient de la toux avec une abondante expectoration fluide et sanguinolente. Cependant, à la percussion, on ne

constatait pas de matité ; à l'auscultation on trouvait des râles disséminés tantôt secs, tantôt humides. Le pouls était fréquent, jusqu'à 120 et 140 à la minute ; la langue blanche, chargée. Quelques-uns des malades avaient sur la peau des pétéchies. Les bubons, proprement dits, faisaient défaut : cependant, chez certains malades les ganglions étaient douloureux et légèrement gonflés. Quant aux phénomènes nerveux, il y eut au début de la maladie de l'extrême lassitude, et ensuite de l'agitation semblable à celle de l'ivresse, qui se terminait par le coma. Souvent les malades gardaient toute leur conscience, même 2 ou 3 heures avant la mort.

Comme exemple je vais citer deux observations, où on trouvera l'exposé détaillé des examens anatomo-pathologique et bactériologique.

I. *Catherine Sémékina*, 54 ans, en soignant son mari, ressentit une grande lassitude le 3/18 août, température 38,9. Les 3 jours suivants la température fut normale, et la malade n'accusa que de la céphalalgie. Le 8/20 août elle eut des frissons, la température monta jusqu'à 39,1-40 ; pouls 104-112 ; elle eut des douleurs dans la poitrine et dans la région de l'omoplate gauche : faiblesse générale, de temps en temps état demi-comateux. Le 9/21 août, température 39, 8-40, 4, pouls 120-140, langue blanche, des pétéchies sur la peau. A l'auscultation : respiration rude, des râles. Le cou est douloureux à la région sterno-cléido-mastoïdienne. Le 10/22 août : mort.

A l'autopsie, faite le jour même de la mort par M. le professeur Lévine [1], on trouva dans la cavité pleurale du poumon gauche 400 c. c. environ de liquide séro-sanguinolent. Sur la plèvre et sur le péricarde, plusieurs ecchymoses.

Le tissu cellulaire du médiastin est œdématié et présente plusieurs foyers hémorragiques. Le lobe intérieur du poumon gauche est hypertrophié et induré, la surface est d'un gris rougeâtre, pas granuleuse, présente des grands et des petits ilots confluents d'épanchements gélatino-hémorragiques, recouvrant le lobe. Le lobe supérieur du poumon gauche et tout le poumon droit sont hypérémiés et œdématiés. Les ganglions trachéobronchiques sont hypertrophiés et ramollis. Les ganglions cervicaux et axillaires sont hypertrophiés et d'un rouge cerise. Les ganglions rétropéritonéaux ont subi les mêmes modifications, et le tissu cellulaire environnant est œdématié et sert de siège à de multiples hémorragies. Les ganglions inguinaux et fémoraux gauches sont aussi hypertrophiés et d'une coloration cerise pourpre. Dans le plus grand ganglion fémoral, on trouve sur la coupe deux foyers nécrotiques d'un jaune grisâtre. La rate est manifestement hypertrophiée, sa capsule est tendue, le parenchyme est d'un rouge cerise. Le foie est volumineux et mou : sur son enveloppe, vers le ligament suspenseur, des foyers

1. Je cite seulement les passages les plus importants du rapport beaucoup plus détaillé de M. le professeur Lévine.

hémorragiques. Dans les autres organes on n'a pas constaté de modifications notables.

II. *Barbe Zlobina*, 9 ans, tombe malade le 9/21 août au soir. A des vomissements : température 40°,4, pouls 160, délire dans la nuit. Le 10/22, au matin, température 39°,4, pouls 100; soir, température 39°,6, la langue blanche, vomissements, délire. Le 11/23 matin, température, 38°,5, pouls 100, la peau est sèche et chaude, expression d'angoisse du visage; soir, température 40°,3. Les ganglions inguinaux et cervicaux sont gonflés. Le 12/24 matin, température 38°,5, pouls 94, respiration 44. Tombe dans le coma : à 10 h. 1/2 matin, mort.

A l'*autopsie*, faite par M. le professeur Lèvine, on constate des pétéchies disséminées sur le thorax, les épaules et les cuisses, grosses tantôt comme une tête d'épingle, tantôt comme un pois. Des petites taches hémorragiques sur les feuillets de la plèvre, sur le péricarde, le péritoine, sur les enveloppes muqueuses de l'estomac et des intestins. Poumons anémiés, perméables à l'air. Cœur dilaté, mou, son muscle à la coupe est d'un gris rougeâtre avec un reflet jaunâtre. Les ganglions axillaires, fémoraux, inguinaux, rétropéritonéaux, mésentériques sont augmentés de volume, mous, d'un rouge cerise sur la surface, à la coupe sont criblés d'hémorragies miliaires et de nodules grisâtres de sphacèle. Le tissu cellulaire environnant les ganglions est le siège de nombreuses hémorragies. La rate est augmentée de volume, son enveloppe est tendue, le parenchyme est ramolli, et d'un brun rougeâtre. Des hémorragies dans la capsule et les ligaments suspenseurs du foie. Reins hypertrophiés : leurs capsules présentent aussi de nombreux foyers hémorragiques. Le tissu cellulaire environnant les calices rénaux est complètement pénétré d'infiltrations hémorragiques.

Outre ces deux cas, l'autopsie a été faite encore sur trois cadavres.

III. *Théodose Séménkine*, 18 ans, tombe malade le 30 juillet/10 août. Meurt le 2/14 août. A l'autopsie, faite par M. le docteur Aroustamof, on trouva une hyperémie prononcée des lobes inférieurs des poumons, augmentation du volume de la rate, des hémorragies miliaires disséminées sur la plèvre, l'endocarde, et l'enveloppe muqueuse de l'estomac.

Dans les autres organes, pas de modifications importantes.

IV. *Marie Zlobina*, 58 ans, avait travaillé le 28 juillet/8 août, meurt le 30. Elle avait de la toux avec abondante expectoration sanguinolente : à l'auscultation on trouvait des râles sifflants; elle avait aussi de la fièvre, et à l'autopsie faite par MM. les docteurs Fédorof et Olchevsky, on trouva une induration du lobe supérieur du poumon gauche, présentant à la coupe des marbrures grisâtres.

A la pression, la surface de la coupe laissait échapper un liquide purulent et rougeâtre. La rate n'est pas hypertrophiée, elle est ferme. Le muscle cardiaque mou, d'une coloration jaunâtre.

V. *Jean Ponamaref*, 80 ans, tombe malade dans la nuit du 6/18 août, meurt le 7/19. Huit jours avant il avait de la céphalalgie et un point de côté. Le 6/18 il a des vomissements et des frissons. Le 7/19, au matin, temp. 39,2, soir 39,4, pouls 132. Les crachats sont mélangés de sang. L'autopsie est

faite par M. le Dr Schmidt. On constata seulement l'hypérémie des poumons, mais sans foyers d'induration, la présence d'un liquide sanguinolent dans la plèvre droite, et des ecchymoses sur cette plèvre.

Des études bactériologiques ont été faites sur trois des cinq autopsiés à Kolobovka : on avait fait des cultures avec les organes, des frottis des sucs d'organes des deux dernières mortes (Catherine Sémékina et Barbe Zlobina). Les premières études bactériologiques étaient faites à Kolobovka même par MM. les Drs Aroustamof et Schmidt, le professeur Lévine et M. Tartakovsky, qui reconnurent que la maladie à laquelle ils avaient affaire était la peste. Ensuite M. le professeur Wyssokovitch et moi, nous avons été appelés à Kolobovka, et, en présence de M. le professeur Lévine, nous avons fait des contre-expériences sur les matériaux recueillis à Kolobovka. Ces expériences de contrôle ont été exécutées à Astrakan, au laboratoire de l'Administration des pêcheries.

Dans les frottis faits avec le suc des organes des personnes mortes à Kolobovka, on trouvait constamment de nombreux bâtonnets en tout semblables à ceux de la peste. Ils étaient surtout nombreux dans les préparations faites avec le suc du poumon et de la rate de Sémékina et de la rate de Zlobina. Dans les coupes de ces organes, nous avons trouvé également une grande quantité de ces mêmes bâtonnets.

En outre, nous avons examiné trois cultures préparées par M. le professeur Lévine ; une faite avec du poumon de Sémékina, une autre avec de la rate de Zlobina, et une troisième obtenue des organes d'une souris qui avait été intoxiquée avec de la rate de Sémékina. Les deux premières cultures étaient identiques à celle de Bombay : bâtonnets courts, immobiles, arrondis à leurs extrémités, ne se colorant pas par le Gram, se développant dans du bouillon sans le troubler. Sur la gélose au bout de 24 heures, à 37°, enduit gluant d'un blanc laiteux. Dans la gélose sucrée, pas de fermentation. Les inoculations tuaient les souris au bout de 2 ou 3 jours et les cobayes le sixième jour. Il se formait à l'endroit même de cette inoculation une infiltration hémorragique avec gonflements des ganglions lymphatiques les plus proches. La rate augmentait de volume. Chez les cobayes, à l'autopsie, on voyait, dans la rate et les poumons, des nodules blanchâtres entourés d'une auréole rouge formée par le tissu

hyperémié. Sur les frottis fait avec l'exsudat formé à l'endroit de l'inoculation, avec le suc de la rate, des poumons, des ganglions lymphatiques et enfin le sang, on trouvait de nombreux bâtonnets de la peste, avec la coloration bi-polaire si caractéristique. Ils étaient en plus grande quantité dans les nodules des poumons et de la rate, et en moindre quantité dans le sang.

Les cultures ne sont pas pathogènes pour les pigeons.

Dans la troisième culture préparée par M. le professeur Lévine, avec des organes de la souris qui fut inoculée à Kolobovka avec de la rate de Sémékina, on trouvait des bâtonnets qui ressemblaient beaucoup à ceux de la peste, et qui étaient pathogènes pour les souris.

Cependant ils se distinguaient des bâtonnets types de la peste par leur développement plus rapide et plus copieux dans les milieux nutritifs, et ils provoquaient la formation de bulles de gaz dans la gélose sucrée. Ce bâtonnet mérite d'être mieux étudié ; il est possible qu'il soit une variété des bâtonnets de la peste ou bien un bâtonnet pseudo-pesteux.

Toutes ces études nous permirent de reconnaître, dans notre rapport présenté le 18 septembre à la Commission de la lutte contre la peste, que l'épidémie qui avait éclaté à Kolobovka était bien une épidémie de peste.

Plus tard, toutes les cultures obtenues à Kolobovka furent de nouveau analysées au fort Alexandre I, près Cronstadt. A ces nouvelles études prirent part les professeurs K. Vinogradof, S. Vinogradsky, N. Tchistovitch, A. Lévine, K. Raptchevsky, M. Tartakovsky, les docteurs Zabolotny, Schmidt et Dsienkovsky. Voici les conclusions de ces bactériologistes :

1) Les cultures présentées par MM. le professeur Lévine, M. Tartakovsky et docteur Schmidt et préparées par ces personnes avec des organes de trois malades (Ponamaref, Sémékina et Zlobina) morts à Kolobovka, ne se distinguent les unes des autres par aucun caractère important.

2) La forme et l'aspect du microbe, ainsi que les particularités de son développement dans des différents milieux de culture, — bouillon, viande pepto-gélatine, viande pepto-gélose, gélose sucrée, et enfin lait, — correspondent exactement à celles du microbe de la peste bubonique.

3) Au même type répondent aussi les propriétés pathogènes

de toutes les cultures analysées au fort. Le microbe cité, injecté sous la peau à une dose modérée, tue les souris en 40-75 heures, les rats en 40-54 heures, les cobayes en 72 heures-cinq jours. Un singe (macacus rhesus), auquel on avait fait une injection sous-cutanée au bras, eut, 24 heures après, 39°,6 et un bubon axillaire du côté correspondant à l'injection.

L'autopsie des animaux ayant succombé à la suite des inoculations de cultures présenta le tableau habituel de la peste expérimentale.

Les études bactériologiques des différents organes de ces animaux donnèrent les mêmes résultats.

4) L'examen microscopique des coupes d'organes des deux personnes mortes à Kolobovka (Zlobina et Sémékina) permit de constater la présence dans ces organes d'une grande quantité de bactéries identiques à celles qui étaient trouvées dans les cultures qu'on avait étudiées au fort, et qu'on rencontre habituellement dans les cadavres des personnes mortes de la peste bubonique.

Ainsi, il est établi avec évidence que la maladie qui avait fait son apparition à Kolobovka fut bien la peste, et en outre la peste dans sa forme la plus maligne. Dans les deux cas (Catherine Sémékina et Marie Zlobina), qui furent étudiés avec le plus de détails, la peste avait revêtu la forme pneumonique, et dans le troisième (Barbe Zlobina), on constata le gonflement général des ganglions. Les études bactériologiques des organes de cette dernière malade démontrèrent que c'était un cas d'infection mixte par les bacilles de la peste, qui se trouvaient en grand nombre, surtout dans la rate, et par les diplo-streptocoques. Le quatrième cas (Theodose Sémékine) était la forme pneumonique pas complètement évoluée. On constatait un grand nombre de bacilles dans la rate et dans le sang.

La marche de la maladie fut très rapide à Kolobovka; elle tuait promptement, avant que les phénomènes locaux puissent s'établir manifestement. Et probablement, c'est par cette haute virulence des bacilles qu'on peut expliquer la particularité de la peste de Kolobovka : sa forme exclusivement pneumonique et septique et l'absence de bubons caractéristiques.

Comment la peste fut-elle importée à Kolobovka? Cette question reste en suspens. Il est possible qu'elle soit venue à

Astrakhan de la Perse, par les pèlerins musulmans, ou, ainsi que le suppose M. le Dr Zabolotny, qu'elle vienne de Mongolie : dans les steppes, s'étendant du Volga à l'Oural, il y a de nombreux Kalmouks bouddhistes nomades.

Avant de terminer, je veux dire quelques mots sur les mesures qui furent prises dans le but de faire cesser l'épidémie. Ces mesures, exécutées sous la surveillance de M. le Président de la Commission de la lutte contre la peste, Son Altesse le prince d'Oldenbourg, consistaient en un isolement complet de la localité infestée. Kolobovka avec la steppe voisine fut entourée par un cordon formé d'abord par les habitants, et ensuite par des soldats. Ce cordon s'étendait le long de 195 verstes. Tous les habitants de la localité furent enregistrés. Les malades étaient transportés dans une maison spéciale qui fut transformée en hôpital. Une autre maison recevait en observation les malades suspects. Les maisons où il y avait eu des cas de peste furent fermées, scellées et brûlées ensuite; on désinfectait celles qui les avoisinaient. Le village fut divisé en quartiers; dans chaque quartier, il y eut un enquêteur, qui deux fois par jour faisait sa ronde dans le quartier, faisait l'appel des habitants et prévenait à l'hôpital s'il y avait un nouveau cas de maladie.

Sur 2 points du cordon il y avait des passages. A l'un d'eux, on avait installé le poste d'observation, muni d'une chambre de désinfection, de bain, et de petites maisonnettes destinées à loger pendant une dizaine de jours de quarantaine les personnes qui devaient quitter la localité infestée.

Les points de passage étaient reliés entre eux et avec la ville de Tsarev par le téléphone. Les morts furent enterrés dans un cimetière spécial et leurs tombes remplies et recouvertes d'une épaisse couche de chaux.

Le 23 août, on commença les inoculations préventives du liquide-sérum de Hafkine. On inocula, en tout, environ 4,000 individus : il ne resta que 40 personnes non inoculées.

La dernière malade qui fut atteinte le 1er août guérit : depuis il n'y eut plus de cas de peste à Kolobovka.

Après avoir brûlé les maisons infestées, et désinfecté celles qui les avoisinaient, le 12 septembre, le cordon de Kolobovka fut levé, mais le poste d'observation y restera jusqu'au printemps.

SUR LA FERMENTATION DU GALACTOSE

ET SUR L'ACCOUTUMANCE DES LEVURES A CE SUCRE

PAR FRÉDÉRIC DIENERT

Travail du Laboratoire des fermentations, à l'Institut agronomique

HISTORIQUE

Le galactose est un hexose stéréoisomère du glucose, et pourtant fermente beaucoup moins facilement que lui. Divers savants, Kiliani, Koch, Hayduck et Herzfeld, ont même soutenu qu'il n'était pas fermentescible. Bourquelot a montré qu'il l'était lorsqu'il était accompagné d'un autre sucre, et ne l'était plus lorsqu'il est purifié. Les contradictions rencontrées dans cette voie tiennent, on le sait maintenant, à deux causes principales. La première, signalée par Tollens et Stone, est que le galactose, qui ne fermente pas dans l'eau pure, peut fermenter avec la même levure quand on ajoute au liquide des aliments azotés. La seconde, signalée par Fischer et Thierfelder, est que l'action dépend de la levure.

Certaines levures attaquent le galactose, tandis que d'autres, dans les mêmes conditions, laissent ce sucre intact. Sous ce point de vue il n'y a pas de différence entre les levures hautes et les levures basses. Ce dernier résultat a été contredit par M. Neumann Wender, mais de récentes expériences de M. Bau ainsi que les miennes confirment les conclusions de MM. Fischer et Thierfelder.

L'existence de levures ne faisant pas fermenter le galactose fut confirmée par les expériences de MM. Voit, Cremer et Bau.

Tous ces faits soulèvent des problèmes curieux, quand on les envisage au point de vue de la production de la zymase alcoolique. Il faut que cette zymase existe ou fonctionne dans certaines levures et pas dans d'autres; que dans une même levure, elle apparaisse dans certains cas et pas dans d'autres. Tout ce qui est relatif à cette question de sécrétion de diastases est en ce moment du plus haut intérêt pour la

science, et j'ai essayé de résoudre quelques-uns de ces problèmes.

Un travail récent de M. Dubourg, paru pendant le cours de mes recherches, a déjà jeté un certain jour sur l'action des levures inactives vis-à-vis du galactose. En étudiant la fermentation des saccharides au moyen de levures reconnues comme inactives vis-à-vis de ceux-ci, ce savant découvrit qu'il suffisait d'employer un milieu riche en azote et d'ajouter au saccharide considéré un peu de glucose pour obtenir la fermentation des deux sucres. Ces résultats sont également vrais quand on remplace le saccharide par le galactose.

Dans le cours de ce travail, en même temps que je montrerai la relation étroite qui unit les levures actives et inactives vis-à-vis du galactose, je ferai voir les changements importants qui surviennent dans l'intérieur d'une cellule à la suite du remplacement d'un hydrate de carbone par un autre.

I

TECHNIQUE

Préparation du galactose pur. — La première condition pour commencer notre étude, c'est d'avoir du galactose pur. Le galactose pur du commerce est mélangé de glucose. C'est ce dernier sucre qu'il faut éliminer. M. Bourquelot avait pour cela fait cristalliser ce sucre dans l'alcool. Le glucose y est soluble, le galactose l'est très peu.

Sa méthode était longue et même quelquefois incertaine. J'ai jugé préférable d'employer un autre procédé déjà signalé par M. Bau, qui consiste à dissoudre le galactose dans un milieu nutritif et à ensemencer dans ce milieu une levure inactive vis-à-vis du galactose. Comme milieu nutritif, j'employai l'eau de touraillons, et je remplaçai le *Saccharomyces apiculatus* de M. Bau par le *S. Ludwigii* dont l'activité était plus grande. Cette levure consomme tout le glucose et laisse inattaqué le galactose. La fermentation finie, on évapore le liquide de façon à le concentrer, on traite le liquide au noir animal pour le décolorer en partie, et on reprend par l'alcool bouillant. Par refroidissement le galactose cristallise. Une deuxième cristallisation est nécessaire.

J'ai vérifié ce procédé de purification de manière à voir si seul le glucose était attaqué.

J'ai fait pour cela des mélanges de galactose purifié d'après la méthode de M. Bourquelot, c'est-à-dire au moyen de l'alcool, avec du glucose pur. Je dissous ces mélanges dans l'eau de touraillons pure, ou additionnée de 1 0/0 de peptone ou de 1 0/0 de phosphate d'ammoniaque. J'ensemence ces milieux au moyen du *S. Ludwigii*. Le dégagement gazeux terminé, je dose le sucre restant au moyen de la liqueur de Fehling. Quel que soit le milieu, j'ai obtenu des résultats semblables dont voici quelques exemples :

Sucre introduit en milligr.		Sucre restant en milligr.
Glucose.	Galactose.	Galactose.
—	—	—
203	94	98
152	142	140
101	188	186

Ces quelques chiffres suffisent pour montrer que le glucose seul a disparu et qu'on retrouve inattaqué tout le galactose introduit.

Cette méthode de purification du galactose en dissolution dans l'eau de touraillons est commode lorsqu'on veut obtenir une solution de galactose pur dans ce milieu nutritif. Il suffit d'évaporer au bain-marie le liquide, et de reprendre par l'eau l'extrait débarrassé de l'alcool et d'une grande partie de sa glycérine.

Pour obtenir le galactose pur et cristallisé, j'ai modifié cette méthode.

Je cultive le *Saccharomyces Ludwigii* dans l'eau de touraillons additionnée de 1 0/0 de glucose. La levure se développe et fait rapidement disparaître le sucre. On soutire alors le liquide fermenté qu'on remplace par une solution stérilisée de galactose dans l'eau distillée : la levure n'a pas été enlevée par le soutirage. Nous verrons à la fin de ce chapitre la méthode suivie pour soutirer aseptiquement le liquide de fermentation.

L'impureté principale, le glucose, disparaît très vite sous l'action de la levure. Le galactose reste mélangé à un peu d'impuretés provenant de la levure. On évapore alors en partie le liquide filtré et on fait cristaliser le galactose. Cette première cristallisation reprise par l'alcool concentré et chaud donne par le refroidissement un galactose très pur.

Procédés de dosage. — J'ai opéré à l'aide de la liqueur de Fehling préparée d'après la formule de Pasteur, pour le dosage

des solutions de galactose. Quand j'avais affaire à un mélange et quand l'emploi du saccharimètre manquait de précision, je me suis servi d'une méthode que voici :

On prélève d'abord une certaine quantité de liquide sucré et on y dose le sucre total au moyen de la liqueur de Fehling.

La seconde portion de ce liquide sucré est stérilisée, additionnée au besoin d'eau de touraillons, et ensemencée avec le *S. Ludwigii*.

La fermentation finie, on détermine le sucre restant par un nouveau titrage à la liqueur cupropotassique, qui donne le galactose restant. Connaissant la quantité totale de sucre et la quantité de galactose restant, il est facile d'obtenir la proportion de sucre mélangé au galactose.

Quand dans le mélange de sucres se trouve du lactose, on remplace le *S. Ludwigii* par une levure de bière très active qui laisse intact ce dernier sucre.

Il m'est arrivé de rechercher la proportion de deux sucres dissous dans un liquide renfermant un antiseptique. J'ai alors modifié un peu la méthode. On commence par cultiver le *S. Ludwigii* dans l'eau de touraillons additionnée de 2 0/0 de glucose. La fermentation finie, on sépare la levure du liquide fermenté en opérant comme nous allons bientôt l'indiquer. On porte alors la levure développée dans le mélange des deux sucres préalablement stérilisés et dilués de façon à diminuer l'influence de l'antiseptique. Après la fermentation, il ne reste plus que du galactose.

J'ajouterai que cette méthode a été préalablement expérimentée, et les résultats nous ont démontré l'exactitude des nombres à 1/50 près.

Dosage du CO^2 *dégagé.* — Dans certaines expériences j'ai été obligé de doser directement la quantité de sucre fermenté en analysant la quantité de CO^2 dégagé pendant la fermentation. Dans des ballons d'un volume assez grand, de façon à ne pas avoir intérieurement une pression de plus de 3 atmosphères, la fermentation terminée, j'introduisais le liquide à fermenter. Après stérilisation j'ensemençais, je faisais le vide dans le ballon au moyen de la trompe à eau.

Il restait encore un ou deux centimètres cubes d'air qui suffisaient pour favoriser le développement de la levure. Je fermais les ballons à la lampe et, la fermentation terminée, j'extrayais le

gaz au moyen d'une trompe à mercure. Je dosais le CO^2 récolté sur le mercure. La quantité de gaz trouvée était transformée d'après la formule

$$C^6H^{12}O^6 = 2CO^2 + 2C^2H^6O$$

en glucose disparu.

Technique employée pour récolter d'une manière aseptique une certaine quantité de levure pure. — Le procédé simple que j'ai employé était le suivant. Je cultive les levures dans des ballons ordinaires (matras Bohème). Le sucre disparu, je soutire le liquide fermenté au moyen d'un siphon de 3 m/m de diamètre préalablement fermé à la lampe et flambé à 180°.

Afin d'éviter l'introduction des poussières par suite de l'aspiration d'air que produit le siphonnement, le siphon était maintenu contre le col du ballon au moyen du bouchon de coton.

Avec un peu d'habitude, la levure reste en grande partie sur le fond du ballon. On la lave alors une première fois avec de l'eau distillée stérile et on la laisse se déposer pendant trois à quatre heures dans un lieu frais. La levure une fois déposée, on soutire le premier liquide de lavage et on le remplace par de l'eau distillée également stérile. On agite bien le ballon de façon à mettre en suspension la levure qu'on enlève ensuite immédiatement du ballon. Un instrument commode pour faire cet enlèvement est une pipette flambée à 170°, de la forme indiquée sur la figure. Elle se compose d'une boule B, terminée par deux tubes recourbés *a* et *b*. Le tube *a* a 3 millimètres de diamètre; comme le siphon, il est fermé à la lampe. Le tube *b* a 7 millimètres de diamètre et est bouché par un tampon de coton. C'est de ce côté qu'aura lieu l'aspiration. Le tube *a* plonge dans le ballon. Sa pointe a été cassée et flambée avant d'être introduite dans le ballon. On aspire par *b*; le liquide et la levure arrivent dans la boule B.

On enlève la pipette du ballon et la levure est portée dans un tube à essai, vide et préalablement stérilisé. Celle-ci se dépose au fond du tube et, 12 heures après, le liquide surnageant est enlevé au moyen d'un siphon. La levure ainsi déposée au fond

d'un tube sera désignée par abréviation, dans le cours de ce travail, sous le nom de *levure en masse*.

L'ensemble des deux lavages ne doit pas durer plus de 24 heures, sinon les cellules vieillissent, leur intérieur devient granuleux et les expériences ne sont plus comparables.

Toutes les fois que j'ai eu besoin d'une certaine quantité de levure pure, je me suis servi de ce procédé.

II

FERMENTATION DU GLUCOSE ET DU GALACTOSE DANS DIFFÉRENTS MILIEUX

Précédemment j'ai indiqué que MM. Fischer et H. Thierfelder avaient découvert certaines levures n'attaquant pas le galactose. Dans ce chapitre je comparerai l'action d'une même levure se développant dans le même milieu nutritif azoté, mais sucré soit avec du glucose, soit avec du galactose ; je laisserai donc de côté les levures inactives vis-à-vis du galactose ; et toutes les levures que j'ai ensemencées dans les expériences suivantes décomposent le galactose comme le glucose en alcool et en acide carbonique.

Je signalerai en passant la fréquence avec laquelle on rencontre ces levures inactives vis-à-vis du galactose. Ainsi, en ensemençant 89 espèces de levures de la collection du laboratoire dans l'eau de touraillons additionnée de 1 0/0 de peptone et de 4 0/0 de galactose pur du commerce, c'est-à-dire dans d'excellentes conditions de nutrition, nous en avons trouvé 23 0/0 qui ne purent faire fermenter le galactose. Cette proportion est à peu près de 1/5, c'est-à-dire assez élevée.

Fermentation du galactose et du glucose dans différents milieux. — Je me suis d'abord demandé quelle était l'influence, sur la fermentation des deux sucres, de diverses substances ajoutées au milieu de culture.

Pour cela j'ensemence une levure dans les trois milieux nutritifs suivants :

Eau de touraillons additionnée de 20 °/₀ de galactose ou 30 °/₀ de glucose.
Mêmes milieux + 2 °/° peptone.
— + 2 °/₀ phosphate d'AzH^3.

Pour deux levures j'ai obtenu les résultats suivants :

Milieu de culture.	Alcool en vol. %.	Poids de lev. milligr
Levure Bass.	—	—
Eau de touraillons + glucose	11,12	48
— + galactose	3,30	50
— + peptone + glucose	16,60	48
— + — + galactose	5,00	52
— + phosph. AzH^3, glucose	12,37	49
— + — + galactose	3,40	51
Levure de Frohberg.		
1) E. de t. + glucose	7,28	35
2) E. de t. + galactose	5,00	31
3) E. de t. pept. + glucose	9,12	39
4) E. de t. — + galactose	7,00	40
5) E. de t. phosph. + glucose	8,12	50
6) E. de t. — + galactose	5,25	51

L'examen de ces chiffres montre déjà que la quantité maximum d'alcool fourni par la levure augmente quand on ajoute de la peptone ou du phosphate d'ammoniaque. L'augmentation a lieu quel que soit le sucre employé.

Mais ces résultats mis sous une autre forme feront mieux voir la non-influence du sucre. Faisons en effet pour un milieu donné le rapport $\frac{\text{alcool du milieu glucosé}}{\text{alcool du milieu galactosé}}$ nous trouvons pour ce rapport :

Milieux de culture	Levure Bass.	Levure Frohberg.
—	—	—
Eau de Touraillons	3,34	1,45
— — + peptone	3,32	1,30
— — + phosphate	3,62	1,54

Pour chaque levure, le rapport ainsi formé est à peu près constant. ce qui revient à dire que l'addition de peptone ou de phosphate augmente dans un même rapport la proportion de glucose décomposé par la levure ainsi que celle du galactose.

En passant, nous constatons que l'azote augmente la quantité d'alcool produite, c'est-à-dire diminue l'influence nocive de ce corps. Cette remarque a été utilisée par M. Dubourg pour rendre actives des levures inactives.

Influence des acides sur la fermentation du galactose et du glucose.

J'ai examiné de même l'influence des acides sur la fermentation du galactose. Je ne citerai pour exemple que le cas de l'acide tartrique, les autres acides se comportant comme celui-ci.

Rajeunissons nos levures dans des matras Pasteur contenant de l'eau de touraillons additionnée soit de glucose. soit de galactose. Les levures rajeunies sont ensemencées dans des tubes contenant des doses variables d'acide tartrique, 0,5 0/0, 1 0/0.

1,5 0/0, etc., et 4 0/0 de sucre qui était pour les uns du glucose, pour les autres du galactose.

Si on examine les tubes contenant du glucose, on voit que la levure s'y développe, quelle que soit l'origine de la semence, mais il n'en est pas de même des tubes contenant du galactose. On constate que les levures rajeunies préalablement en présence de galactose supportent dans ces conditions des doses d'acides plus fortes que celles rajeunies seulement en présence du glucose. Ainsi 2 0/0 d'acide arrêtaient ou empêchaient la fermentation du galactose avec ces dernières levures et non avec les premières.

Nous constatons donc l'influence de l'origine de la semence; et sur ce sujet nous aurons l'occasion de revenir.

Au microscope il est impossible de constater une différence dans la forme des cellules qui se révèlent ainsi inégales.

Si on écrase sous la lamelle du microscope une levure, en appuyant au moyen d'un agitateur qu'on déplace, on constate que les cellules se rompent plus ou moins facilement. Les cellules rondes se déchirent plus facilement que les cellules allongées, et les grandes mieux que les petites. Mais l'âge ainsi que l'accoutumance à un sucre (glucose ou galactose) ne facilitent ni ne retardent cet écrasement des cellules.

Si donc la culture d'une levure sur un milieu nutritif additionné de galactose diffère de la culture de la même levure sur un milieu nutritif additionné de glucose, ce sera par la physiologie de la cellule et non par sa morphologie.

III

ACCOUTUMANCE DES LEVURES AU GALACTOSE

Nous venons de reconnaître l'influence possible de l'origine de la semence sur la fermentation du galactose.

D'autres expériences nous permettent de constater le même fait. Je citerai par exemple celle-ci : J'ensemence dans du liquide Laurent, additionné de 0,5 0/0 de peptone et de 4 0/0 de galactose, une levure développée depuis 1 mois dans un matras Pasteur. Si ce dernier avait renfermé préalablement du glucose, la levure ne se développe pas dans le liquide Laurent. Si au lieu de glucose le matras avait renfermé du galactose, la levure se développe très bien.

Avec une levure ensemencée jeune, l'influence de l'origine de la semence est nulle.

Pour mieux nous rendre compte de cette influence, changeons notre manière d'opérer et réduisons au minimum la multiplication de la levure pendant la durée de nos essais. Si une levure cultivée dans un même milieu en présence de différents sucres possède des propriétés différentes, celles-ci persisteront tant que les levures ne se multiplieront pas et il sera facile de les mettre en évidence.

Pour rendre minima la multiplication, nous avons opéré de la manière suivante : dans 100 c. c. d'un milieu nutritif donné, on cultive une levure pure. En employant le procédé décrit au chapitre I, on décante la levure et on la place dans des tubes. On obtient de cette façon dans chaque tube de $0^{gr},100$ à $0^{gr},130$ de *levure en masse*. En faisant agir cette levure en masse sur 5 c. c. d'une solution de glucose ou de galactose, nous faisons une fermentation avec 20 fois plus de levure qu'il ne s'en serait développé si on avait ensemencé ce volume de liquide avec une trace de levure. On est donc dans les conditions connues depuis Pasteur et Brown comme ralentissant beaucoup ou même empêchant la multiplication. J'appellerai pour abréger *levure habituée à un sucre donné*, une levure obtenue en la cultivant dans l'eau de touraillons additionnée du sucre considéré.

Expérience I. — Prenons un certain nombre de tubes renfermant de la levure en masse habituée soit au glucose soit au galactose. Dans chacun j'introduis 5 c. c. d'une solution de galactose à 6 0/0. On les place à l'étuve à 25° et on note le moment où on peut compter 1 bulle gazeuse par seconde. Ce moment est considéré comme le commencement de la fermentation. Tous les tubes renfermant la levure habituée au galactose fermentent au bout de 2 heures. Ceux qui renferment la levure habituée au glucose restent pendant 24 heures et souvent plus longtemps sans manifester la moindre fermentation. La même expérience répétée en remplaçant la solution de galactose par 5 c. c. d'une solution de glucose ne permet pas de différencier les levures accoutumées ou non au galactose.

Donc en réduisant, comme nous le faisons, la multiplication, nous constatons une très grande différence entre le moment où la fermentation du galactose commence dans les tubes renfer-

mant des levures habituées à ce sucre et dans ceux renfermant des levures habituées au glucose. Une fois la fermentation du galactose commencée par ces dernières, elle marche aussi vite qu'avec les levures habituées au galactose. Il faut donc penser qu'un travail intérieur a dû se faire pendant la période d'inactivité de la levure.

Nous laissons de côté pour le moment les levures de lactose. C'est que celles-ci, habituées au glucose, manifestent une certaine habitude au galactose. Ainsi, au bout de 2 heures, chez certaines de ces levures habituées au glucose, on obtient un commencement de fermentation du galactose, mais il faut ajouter qu'habituées au galactose ou au lactose ces levures manifestent une activité vis-à-vis du galactose presque inconnue chez les autres. Voici en effet quelques nombres.

Levure lactose.	Origine.	La fermentation commence après
Duclaux.	Saccharose.	24 heures.
	Galactose.	1 heure.
Kayser.	Saccharose.	2 heures.
	Galactose.	1 heure.
	Lactose.	30 minutes.

L'acclimatation est donc encore ici manifeste. Elle est plus sensible encore quand on habitue les levures au lactose.

Expérience II. — Les résultats de la première expérience se rapportent à des levures habituées au glucose ou au galactose. Voyons l'action des autres sucres (lévulose, saccharose, maltose, mélibiose, lactose).

Dans des tubes renfermant une *levure en masse* habituée à l'un ou l'autre de ces sucres, nous introduisons 5 c. c. d'une solution de galactose. Si nous désignons par *Tm* le temps mort pendant lequel toute fermentation semble nulle dans les tubes, nous obtenons les résultats suivants avec deux levures :

	Origine.	T. m.
Levure de lactose.	Saccharose.	2 heures.
	Galactose.	1 heure.
	Lactose.	1/2 heure.
	Maltose.	2 heures.
Levure de Frohberg.	Glucose.	2 jours.
	Saccharose.	2 jours.
	Lévulose.	2 jours.
	Mélibiose.	1 heure.
	Galactose.	1 heure.

Le saccharose, le glucose, le lévulose, le maltose, c'est-

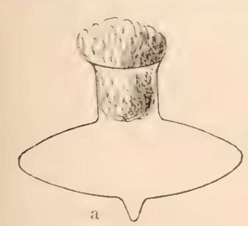
à-dire tous les sucres qui ne peuvent par hydrolyse donner du galactose, donnent des levures qui manifestent un temps mort considérable quand on les met *en masse* en présence de galactose. Au contraire le lactose et le mélibiose, sucres qui, sous l'action des acides ou de diastases, la lactase ou la mélibiase, donnent du glucose et du galactose, sont les seuls avec le galactose capables d'acclimater les levures à ce sucre.

Les mêmes levures habituées à ces différents sucres, mais qui reçoivent du glucose en place de galactose, ne manifestent aucun temps mort comme précédemment avec le galactose, l'activité étant sensiblement la même quel que soit le sucre duquel la levure tire son origine.

Je dis sensiblement la même, car si on prend une levure habituée au glucose et au lévulose par exemple, et qu'on la fasse agir sur une solution de glucose, on constate chez la première une activité légèrement supérieure. Avec ces mêmes levures, mais mises en présence d'une solution de lévulose, l'ordre est inverse : cependant ces différences sont si faibles que nous les négligerons.

En résumé, toute levure faisant fermenter le galactose a dû s'habituer préalablement à ce sucre. Cette condition n'est pas nécessaire pour le glucose. Cette différence est très importante.

Expérience III. — Pour bien montrer les conditions nécessaires de cette différence entre les levures habituées au galactose et celles qui ne le sont pas, modifions un peu le dispositif de l'expérience I. Prenons trois ballons aplatis comme l'indique la figure. Dans chacun de ces ballons nous introduisons 400 c. c. d'eau de touraillons additionnée dans l'un de glucose, dans un second de maltose et dans le troisième de galactose. On ensemence et, une fois la levure développée, on soutire le liquide en faisant en sorte que la levure reste au fond du ballon. Celle-ci est lavée, et on s'arrange de façon que toute la levure reste dans la petite cuvette *a*. L'eau de lavage est remplacée par une solution de galactose. 24 heures après, on analyse chaque ballon et on trouve :



			Sucre fermenté %
Ballon renfermant eau	de touraillons	glucose................	3,80
—	—	maltose................	3,70
—	—	galactose..............	4,02

La *levure en masse* a pu se multiplier sur le fond du ballon et a permis aux cellules de s'accoutumer rapidement au galactose au point de rendre nulle l'influence de leur origine.

Rapport entre l'activité de la fermentation du glucose et celle du galactose. — Si on fait agir une levure habituée au galactose sur une solution de glucose ou une solution de galactose, on constate qu'il existe un rapport entre les quantités de glucose et de galactose fermentées par un poids donné de levure au bout de 24 heures.

Voici quelques valeurs trouvées pour ce rapport R avec différentes levures.

Levure	Poids de levure en milligr.	Valeur de R.
—	—	—
Levure Bass.	108	1,6
Levure distillerie Alfort	91	1.65
Levure de vin N° 6	85	1,5

Pour toutes les levures que j'ai étudiées après les avoir habituées au galactose, ce sucre fermente 1,6 fois moins vite que le glucose. Chez les levures habituées au glucose, la valeur de R au bout de 24 heures est généralement égale à ∞. A mesure que la levure s'acclimate, ce rapport diminue.

Cette valeur de R = 1,6 nous sera utile dans un chapitre prochain pour nous rendre compte du degré d'accoutumance des levures au galactose. La valeur de R pour les levures de lactose habituées au glucose est égale à 4 ou 5 après 24 heures. Nous dirons que ces levures sont en partie accoutumées au galactose[1].

1. MM. Buchner et Rapp, opérant avec la zymase alcoolique qu'ils retirèrent de levures non acclimatées, ont trouvé les quantités suivantes de CO^2 dégagé en présence de 1 0/0 de toluène.

		Co^2 dégagé après		
Sucre.	Concentration.	16 heures.	24 heures.	40 heures.
		—	—	—
Glucose	3%	0,40	0,61	0,70
Galactose	3%	0,08	0,11	0,12
Valeur de R.		5	5,5	5,8

Les valeurs de R qu'on tire des résultats de MM. Buchner et Rapp sont plus élevées que celles tirées de nos expériences.

Durée de l'acclimatation. — L'accoutumance une fois établie chez une cellule persiste-t-elle, et dans quelles conditions persiste-t-elle? Pour le savoir, on peut prendre une série de tubes renfermant de la *levure en masse* habituée soit au glucose soit au galactose. Je désignerai par des numéros impairs *1* et *3* les tubes renfermant les levures habituées au premier sucre, et par des numéros pairs *2* et *4* ceux renfermant les levures habituées au galactose.

Ceci fait, j'ajoute 4 c. c. d'une solution de glucose à 31 0/0 dans les tubes *1* et *2*, et 4 c. c. d'une solution de galactose à 10,91 0/0 dans les tubes *3* et *4*.

Le temps mort est de 1 heure dans les tubes *1*, *2* et *4*, il est de 24 heures dans le tube *3*.

Au bout de 5 jours la fermentation est terminée, sauf dans le tube *3* où tout dégagement gazeux cesse seulement au bout de 10 jours. Aussitôt la fermentation achevée dans un tube, on soutire le liquide fermenté, on lave la levure à l'eau distillée et on y introduit une nouvelle solution sucrée.

Les tubes *1*, *2* et *3* reçoivent deux c. c. d'une solution de galactose à 7,09 0/0 et le tube *4* deux c. c. d'une solution de glucose à 10 0/0.

Une heure après l'introduction du liquide sucré, le dégagement gazeux commence dans les tubes *3* et *4*, et seulement au bout de 4 heures dans le tube *2*. La levure du tube *3* s'est donc accoutumée au galactose, celle du tube *2* a conservé une partie de ses anciennes propriétés, malgré la proportion assez grande de glucose que cette levure a dû décomposer. Son accoutumance n'a donc pas disparu.

La levure du tube *1*, épuisée par une première fermentation de glucose, renfermant un protoplasma vieilli, n'a cependant pas perdu la propriété de s'habituer au galactose. Elle y met beaucoup plus de temps que précédemment la levure du tube *3*. Son temps mort est de 4 jours au lieu de 24 heures, mais ce temps est sans importance, cette levure s'accoutume encore.

L'exemple que je viens de rapporter est relatif à une levure qui s'acclimate assez facilement.

Je résume dans un tableau synoptique l'exemple d'une autre levure (une levure de bière haute : la levure Bass) qui compte parmi les plus longues à s'acclimater.

Tube 1.	Tube 2.	Tube 3.	Tube 4.
—	—	—	—
reçoivent 4 c. c. solution de glucose.		reçoivent 4 c. c. solution de galactose.	
La fermentation commence après			
2 heures.	2 heures.	48 heures.	2 heures.
Tout dégagement gazeux cesse après			
5 jours.	5 jours.	10 jours.	5 jours
On ajoute après la fin du dégagement gazeux du			
galactose.	galactose.	galactose.	glucose.
La fermentation commence après			
5 jours.	12 heures.	1 heure.	1 heure.

On ajoute du galactose dans le tube 4, la fermentation commence au bout de 12 heures.

Ces deux exemples nous montrent donc que lorsqu'une levure accoutumée au galactose fait fermenter du glucose, elle perd en partie son acclimatation. Mais dans le cas de levure en masse, cette perte n'est que partielle. Avec la levure Bass, où cette perte est maximum, une levure ainsi traitée se rappelle encore très bien son acclimatation primitive.

Cette propriété est donc d'une stabilité relative, mais il reste acquis que la présence du galactose est nécessaire pour que l'accoutumance reste maximum. C'est ce qui arrive également chez les animaux qui perdent de leur immunité contre une toxine, dès que la toxine cesse d'agir.

Expérience IV. — Complétons l'expérience précédente, mais au lieu de faire agir la *levure en masse* sur une solution de sucre fermentescible par elle, faisons-la macérer dans l'eau distillée ou en présence d'un sucre non fermentescible par elle, comme le lactose. Au bout de 8 jours on introduit sur cette levure une solution de galactose. Si celle-ci avait été préalablement acclimatée au galactose, la fermentation commence rapidement mais cesse bientôt, l'alcool produit devenant nuisible.

Une levure habituée au glucose s'acclimate très bien au galactose après cette macération, et est même moins sensible à l'influence de l'alcool que la levure préalablement habituée au galactose.

De cette expérience nous retenons ce fait qu'une levure acclimatée, restant dans l'eau sans addition de sucre, conserve la propriété d'attaquer au bout de 1 ou 2 heures le galactose

qu'on lui fournit. Quant à l'action funeste de l'alcool, elle peut tenir à des causes très variées dans l'étude desquelles nous ne pouvons entrer.

Il faut donc, pour que la levure perde son accoutumance, qu'on lui fournisse un sucre fermentescible autre que le galactose.

En résumé, nous venons de voir et de démontrer qu'une levure dont le développement s'était effectué en l'absence de galactose éprouve pendant un certain temps une sorte de répulsion pour ce sucre avant de l'attaquer. Nous désignerons ce temps sous le nom de *période d'accoutumance*.

Une fois habituée au galactose, la levure possède la propriété de décomposer le glucose 1,6 fois plus vite que le galactose.

Cette accoutumance peut disparaître en partie quand un autre sucre est donné à fermenter à la levure ; mais, en laissant simplement la levure macérer dans l'eau, elle ne perd pas la faculté d'attaquer rapidement le galactose ; si elle est accoutumée, elle devient seulement plus sensible à l'action de l'alcool.

IV

INFLUENCE DE CERTAINES SUBSTANCES SUR L'ACCOUTUMANCE ET LA FERMENTATION DU GALACTOSE

Maintenant que nous savons qu'une période d'accoutumance existe chez toutes les levures non habituées au galactose, étudions l'influence possible, même probable, de diverses substances qui peuvent favoriser ou retarder le moment où la levure devient capable d'attaquer ce sucre. Ces substances peuvent être indifférentes pendant la période d'accoutumance, mais agir sur la fermentation du galactose et l'entraver.

Avant d'entrer dans l'étude de l'action de ces substances, je signalerai certains corps ou même certains facteurs qui sont indifférents soit sur l'accoutumance, soit sur la fermentation du galactose.

Causes indifférentes — Il demeure entendu qu'il n'existe aucune différence entre les levures hautes et les levures basses dans leur durée d'acclimatation au galactose. Cette durée est très variable, elle est de 3 heures pour une levure de lactose et de 72 heures pour certaines levures de bière.

Le milieu nutritif qui a servi au développement de la levure avant son introduction dans les tubes flambés est également indifférent. Ainsi je remplace l'eau de touraillons qui me servait comme milieu de culture par du liquide Raulin, du liquide Laurent, de l'eau de levure, des bouillons, etc., et les levures développées dans de tels milieux, mises en masse, se comportent exactement de la même manière quand on les fait agir sur une solution de galactose pur.

Causes qui influent : *Influence de l'air.* — Elle n'est pas très sensible. Nous avons vu qu'une levure de lactose habituée au glucose pouvait attaquer le galactose au bout de 2 heures. Or, une condition est nécessaire pour obtenir ce résultat, c'est que la levure ait à sa disposition une certaine quantité d'oxygène. Si on remplace les matras de Bohême, qui nous ont servi comme ballons de culture, par un ballon permettant de faire une culture en profondeur, on constate que la durée d'accoutumance a considérablement augmenté, et atteint 8 et même 12 heures. En diminuant l'arrivée de l'air, on retarde l'acclimatation. Pour les autres levures, l'air semble être indifférent.

Influence de la concentration du sucre. — Dans les expériences rapportées précédemment, j'ai toujours fait développer mes levures dans des milieux contenant 2 0/0 de sucre. Cette concentration avait été choisie de telle sorte que la levure, au bout de 3 jours, ait fait disparaître tout le sucre. On eût pu, dans la majorité de nos expériences, opérer avec une concentration moitié moindre, mais il n'en est pas toujours ainsi.

Si nous ensemençons une levure de lactose dans des liquides où la concentration du sucre aille en décroissant, on constate que cette levure, mise en masse en présence de galactose, s'acclimate plus ou moins rapidement selon la concentration du liquide originel. Ainsi, en opérant avec de l'eau de touraillons renfermant 2 0/0, 1 0/0 et 0,5 0/0 de glucose, nous avons obtenu les résultats suivants :

Concentration du glucose.	Durée d'accoutumance.
—	—
2 %	3 heures.
1 %	8 heures.
0,5 %	36 heures.

Plus il y avait de sucre originellement, plus la durée d'accou-

tumance est courte. Certaines levures de lactose qui semblaient faire un groupe à part, à cause de leur courte durée d'accoutumance, rentrent dans la catégorie des autres levures quand on diminue la concentration du sucre du milieu de culture.

Avant de passer à l'étude des substances qui influent soit sur l'accoutumance des levures au galactose, soit sur la fermentation de ce sucre, il faut ouvrir une parenthèse, nécessaire pour expliquer les modifications techniques qu'il a fallu apporter dans le but d'éviter de grossières erreurs.

Absorption du galactose par les levures. — Si on prend une *levure en masse* habituée seulement au glucose, par exemple, et qu'après l'avoir fait agir 12 heures sur une solution de galactose, on dose le sucre restant (aucun dégagement gazeux n'ayant eu lieu) on constate une disparition de sucre non accompagnée de gaz carbonique.

Voici en effet quelques résultats :

Levures.	Concentration du galactose.	Sucre restant.	Poids levure milligr.
—	—	—	—
Levure de vin N° 6.	6 %	5,29	250
Levure de bière Bass.	6 %	5,00	209
Distillerie Alfort.	6 %	5,09	290

Avec les levures inactives vis-à-vis du galactose, on trouve des résultats identiques :

S. Ludwigii.	6 %	5,20	540
S. Apiculatus.	6 %	5,20	360

Cette propriété semble spéciale au galactose. Avec les levures ne sécrétant pas de maltase ou de lactase, le maltose et le lactose introduits à la place de galactose se retrouvent intégralement dans les conditions de l'expérience précédente.

Les levures ne sont pas seules à produire ce phénomène. En diffusant simplement avec des dialyseurs ordinaires une solution contenant soit du galactose pur, soit un mélange de glucose et de galactose, on constate encore une absorption de galactose. La membrane dialysante était en parchemin animal. En analysant au bout de 4 heures les différentes proportions de galactose et de glucose dialysé, nous avons trouvé les résultats suivants :

Sucre introduit en milligr.		Sucre dialysé en milligr.		Sucre non dialysé en milligr.		Différence en milligr.
glucose.	galactose.	glucose.	galactose.	glucose.	galactose.	galactose.
—	—	—	—	—	—	—
154	0	68	0	86	0	0
102	48	45	15	57	27	8
51	97	22	31	28	54	16
0	145	0	45	0	77	25

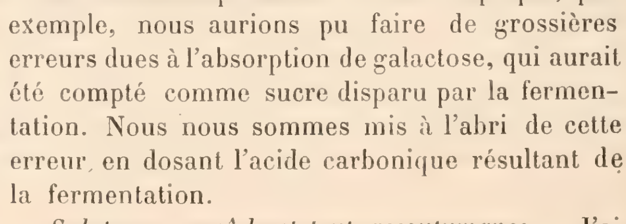
La quantité de sucre manquant représente du galactose, et celle-ci croît proportionnellement à la concentration du sucre.

Pour désigner cette disparition de galactose, nous dirons que le galactose a été absorbé par la levure.

Cette absorption de galactose doit être consécutive d'une diffusion, car il suffit de tuer les levures en les portant à 100° pour empêcher ce fait de se produire.

Ces phénomènes d'absorption ont été déjà signalés par Graham, je ne les mentionne que pour expliquer les modifications que j'ai dû apporter aux procédés d'analyse. Une fois la levure acclimatée, le galactose absorbé disparaît.





Si nous nous étions contentés de doser le galactose restant après l'action d'une levure en présence d'un antiseptique, par exemple, nous aurions pu faire de grossières erreurs dues à l'absorption de galactose, qui aurait été compté comme sucre disparu par la fermentation. Nous nous sommes mis à l'abri de cette erreur, en dosant l'acide carbonique résultant de la fermentation.

Substances empêchant toute accoutumance. — J'ai donc apporté à la technique suivie jusqu'ici quelques modifications que je vais indiquer. Biernacki, dans ses études classiques sur l'action des antiseptiques, a montré qu'elle dépend de leur poids et de leur concentration. Elle dépend en outre de la quantité de levure employée.

Il fallait donc trouver un moyen de sécher une levure tout en la conservant pure, et de la peser également sans l'infecter.

Dans un tube à essai assez large et préalablement flambé, j'introduis de l'acide sulfurique pur. D'autre part je prends un petit tube contenant de la *levure en masse* et pure. Ce tube flambé extérieurement est introduit rapidement dans le tube plus large

contenant SO^4H^2, après avoir été débarrassé de son tampon de coton, de façon à accélérer la dessiccation de la levure. Les tubes ainsi préparés sont placés sous la cloche à vide à la température de 25°. Le temps de séchage dure 4 à 6 jours suivant la levure. Celle-ci sèche, on retire le petit tube au moyen d'une pince. On lui remet un bouchon flambé et on pèse le tube plein. Comme il avait été préalablement pesé vide, l'augmentation du poids représente le poids de la levure sèche.

Sur cette levure sèche on introduit 2 c. c. d'une solution de glucose ou de galactose avec l'antiseptique à étudier. On place ce petit tube dans un ballon à col assez long, on y fait le vide et on ferme le ballon à la lampe. On dose l'acide carbonique dégagé.

Influence de l'acide borique. — On sait que l'acide borique agit d'une façon toute particulière sur la levure en facilitant son dépôt. Son action n'est pas moins intéressante sur l'accoutumance des levures au galactose. Si on fait agir une *levure en masse* habituée au glucose sur une solution de galactose additionnée de 0,66 0/0 d'acide borique, on ne constate aucun dégagement gazeux. La levure est dans l'impossibilité de s'acclimater à ce sucre. On obtient le même résultat si, au lieu d'employer une levure séchée, on employait une levure jeune.

Mais, à la place d'une solution de galactose, employons une solution de glucose. La fermentation se déclare aussi rapidement qu'en l'absence d'antiseptique. La dose d'acide borique employée n'était pas suffisante pour empêcher toute fermentation alcoolique du glucose, elle est largement suffisante pour ne pas permettre à une levure de s'accoutumer au galactose.

Pour bien montrer que l'acide borique n'agit pas en empêchant la fermentation du galactose, nous remplaçons notre levure habituée au glucose par la même espèce, habituée cette fois au galactose. L'acide borique, dans cette expérience, agit sur la fermentation du galactose comme sur celle du glucose, en diminuant légèrement à cette dose l'activité de la fermentation.

Avec une levure accoutumée au galactose, le rapport

$$R = \frac{\text{Vitesse fermentative du glucose}}{\text{Vitesse fermentative du galactose}}$$

est après 24 heures sensiblement égale encore à 1,6.

L'acide borique agit donc simplement sur la cellule non acclimatée, empêchant l'accoutumance de se produire.

Pour toutes nos levures, l'acide borique s'est comporté de cette façon.

L'existence des levures inactives vis-à-vis du galactose tient, peut-être, à la présence dans leur intérieur d'une substance agissant à la manière de l'acide borique, et cet antiseptique nous permet de faire passer, dans la catégorie des levures inactives, une levure réputée active vis-à-vis du galactose.

La présence de glucose n'empêche pas l'action de l'acide borique sur l'accoutumance. En faisant fermenter un mélange de glucose et de galactose en présence d'acide borique avec de la *levure en masse* habituée au glucose [1], on retrouve inattaqué le galactose introduit.

Si, au bout de 24 heures, le rapport R = 1,6, il ne faut pas croire qu'il en sera toujours ainsi. Si on note la durée du dégagement gazeux, on trouve les résultats suivants :

	Sucre introduit 440 milligr.	Durée de la fermentation.	Poids levure milligr.
Levure acclimatée au galactose.	+ 2 c.c. glucose.	3 jours.	65
	+ 2 c.c. galactose.	6 jours.	82
	+ 2 c.c. glucose + 0 gr. 02 BoO^3	5 jours.	65
	+ 2 c.c. galactose + 0,02 —	6 jours.	102
	+ 2 c.c. glucose + 0,04 —	4 jours.	73
	+ 2 c.c. galactose + 0,04 —	10 jours.	77

On peut remarquer la durée assez longue de la fermentation du galactose en présence de 0 gr. 04 de BoO^3. Ce résultat tient à l'influence de l'alcool combinée avec celle de ce corps.

En résumé, l'acide borique agit sur les levures non habituées au galactose et empêche toute accoutumance.

Son action sur la fermentation du galactose est comparable à celle sur la fermentation du glucose.

Influence du toluène. — Le toluène comme l'acide borique empêche l'accoutumance au galactose. Les levures de lactose habituées au glucose font exception à cette règle générale. En étudiant l'influence de l'acide borique. nous avons laissé de côté ces levures parce que leurs cellules sont très sensibles à l'action de ce corps aux doses que nous employions.

Les levures de lactose habituées au glucose sont en partie accoutumées naturellement au galactose : aussi s'explique-t-on la non-influence du toluène sur elles.

1. Les levures habituées au lévulose, maltose et saccharose se comportent comme les levures habituées au glucose.

Le toluène possède le désavantage d'être peu soluble dans l'eau; nous avons été obligé, dans l'impossibilité de varier les doses, d'opérer dans des conditions telles que le liquide sucré en était saturé. Dans nos tubes renfermant les *levures en masse*, on ajoute le liquide sucré et une épaisseur de 1 cm. de toluène, de façon à maintenir l'eau saturée, ce corps étant assez volatil.

Aussitôt que l'antiseptique a disparu, les levures non acclimatées s'accoutument au galactose, sauf dans quelques cas particuliers que nous rencontrerons plus loin.

Mais entre l'action du toluène et celle de l'acide borique existe une différence. Avec ce dernier, 100 mg. de levure font disparaître facilement 400 mg. de galactose dissous dans 2 c. c. de liquide. Avec le toluène, le dégagement gazeux cesse 12 à 24 heures après le commencement de la fermentation. La proportion de sucre fermenté est à peu près de 2 0/0. Voici quelques résultats obtenus avec une levure accoutumée au galactose et additionnée soit de glucose, soit de galactose.

					Sucre fermenté 0/0	Poids de levure en mill.
Levure de vin	mise en présence de	2 c. c. Sol.	glucose +	1 c. c. toluène.	1,7	53
—	—	—	galactose +	—	1,6	50
Lev. de distillerie	—	—	glucose +	—	1,52	33
—	—	—	galactose +	—	1,91	30

Le toluène agit sur l'acclimatation et aussi sur la fermentation alcoolique, et avec la même énergie, quelle que soit la nature du sucre décomposé.

Cette action du toluène est due à l'influence de ce corps augmentée de celle de l'alcool.

Il suffit d'ajouter des solutions sucrées additionnées de 1 0/0 d'alcool avec le toluène pour ne pas constater de fermentation. Le protoplasma de la cellule est atteint, car en faisant macérer une levure dans l'eau additionnée de 1 0/0 d'alcool et de 1 c. c. de toluène, on constate après 4 jours que la levure est morte. Au microscope, la levure laisse voir un protoplasma très granuleux.

Le toluène seul exerce déjà une certaine action sur les levures. Si l'on prend une levure acclimatée ou non au galactose, et qu'on la fasse macérer dans l'eau additionnée de toluène pendant 8 jours à 25°, on constate un retard dans l'apparition

du dégagement gazeux, quand on fait agir de la levure sur le galactose ou un autre sucre.

Voici pour une levure ce qu'on trouve:

		Dégagement gazeux manifeste au bout de :	Poids de levure en millig.
Levure acclimatée mise en présence de :	2 c. c. Sol. glucose 10 °/₀ + 0 c. c. 2 toluène.	2 heures	73
	— galactose 10 °/₀ + —	2 heures	70
Levure non acclimatée mise en présence de :	2 c. c. Sol. glucose 10 °/₀ + 0 c. c. 2 toluène.	6 heures	84
	— galactose 10 °/₀ + —	3 jours	100
	— glucose........................	2 heures	88
	— galactose........................	2 jours	80

Dans toutes ces expériences, la levure non acclimatée semble plus sensible à l'action du toluène que la levure acclimatée.

L'action combinée de toluène et d'alcool est, comme dans les expériences de Biernacki, plus forte que celle résultant de la somme des actions réciproques de ces deux corps.

Quand on cultive les levures dans des milieux riches en peptone, l'influence du toluène se fait beaucoup plus sentir.

Nous mettons *en masse*, dans des tubes, une levure provenant d'une culture dans l'eau de touraillons additionnée de 1 0/0 de peptone, et on ajoute dans chacun une solution de toluène dans l'eau. Au bout de 4 jours le toluène est évaporé, on ajoute alors une solution de galactose et on constate ceci. Dans les tubes qui renferment la levure acclimatée, un dégagement gazeux commence après 24 heures, tandis que les levures non acclimatées, soumises à ce traitement, sont devenues incapables de s'acclimater. La levure est cependant vivante : il suffit de la transporter dans un milieu nutritif sucré pour qu'elle se développe facilement.

Reprenons les tubes contenant une *levure en masse* acclimatée au glucose en présence de peptone, mais au lieu de la faire agir sur une solution de galactose, nous introduisons dans le tube une solution de glucose avec 0,2 c.c. de toluène. On ne constate de fermentation qu'après la disparition du toluène. La levure n'était pas morte, et il y a lieu de penser que, pendant la macération dans l'eau additionnée de toluène, celle-ci a perdu sa zymase détruite par ce traitement.

La levure non accoutumée, traitée comme nous venons de l'indiquer, et transportée dans l'eau de touraillons additionnée de galactose, ne peut se développer ni faire fermenter ce sucre.

Voici donc une levure qu'une simple macération dans l'eau additionnée de toluène rend inactive vis-à-vis du galactose.

Pour lui rendre son activité, il suffit d'ajouter une trace de glucose qui, redonnant la jeunesse aux cellules, les met dans les conditions nécessaires pour s'accoutumer au galactose.

Les levures accoutumées soumises au toluène peuvent très bien se développer dans l'eau de touraillons galactosée. Il semble même que, dans ces conditions, la zymase de ces levures résiste bien mieux que celle des levures non accoutumées.

Comme ces phénomènes d'acclimatation sont assez généraux, nous pouvons rechercher des rapprochements chez les microbes avec les faits que nous constatons.

Ainsi cette action du toluène sur la zymase d'une levure peut être rapprochée, à mon avis, de ce qui se passe chez un microbe très virulent. Ce microbe, placé primitivement dans des conditions très favorables, se développe, mais son activité passe par un maximum. Au bout d'un certain temps les conditions deviennent défectueuses et les cellules résistent d'autant moins que l'activité avait été plus grande : le microbe perd de sa virulence. Pour la récupérer il lui faut des conditions spéciales, comme dans notre expérience la présence du glucose est nécessaire à la levure.

Mais où l'embarras commence, c'est quand on veut fournir une explication satisfaisante des résultats obtenus. On pourrait dire, par exemple, en admettant avec Buchner que l'action des diastases protéolytiques détruit la zymase, que la peptone a favorisé la sécrétion de ces diastases, et qu'en présence de toluène ces diastases protéolytiques ont continué à agir, peut-être ont augmenté d'activité et ont détruit la zymase. Cette explication ne repose sur aucun fait bien précis. La vérification est difficile, et les expériences que j'ai entreprises dans cet ordre d'idées ont toujours abouti à des résultats négatifs. Je veux bien que ces insuccès n'infirment rien, les diastases protéolytiques agissantes pouvant ne pas diffuser.

On peut donner une autre explication, qui ne nous renseigne pas davantage sur le mécanisme de la destruction de la zymase, mais qui repose sur une observation dont la généralité semble s'étendre sur beaucoup de cellules. Toutes les fois qu'on augmente outre mesure l'activité d'une cellule, il se produit bientôt une réac-

tion inverse qui tend à affaiblir cette cellule rendue précédemment trop active. Ce fait semble général même pour les cellules des organismes. Quand on fournit des excitants à des animaux, après l'excitation survient l'abattement. Si à ce moment une cause nuisible survient, l'action nuisible se trouvera augmentée par suite de l'affaiblissement de la cellule. C'est ce qui arrive aux levures développées en présence de peptone et sur lesquelles le toluène a ensuite agi. Du reste, toute cause capable d'augmenter l'activité d'une cellule doit être suivie d'un affaiblissement. Ainsi, le phosphate d'AzH^3 remplaçant la peptone dans le milieu de culture fournit des levures sensibles à l'action du toluène, mais moins sensibles que dans le cas de la peptone.

Une levure habituée au glucose, agissant sur un mélange de glucose et de galactose additionné de toluène, ne fait pas fermenter le glucose seul. Le même résultat est obtenu avec une levure acclimatée au galactose. Pour expliquer ce fait qui semble anormal, nous ferons remarquer que le glucose fermente plus vite que le galactose. Or les petites quantités d'alcool produites au commencement suffisent pour modifier l'intérieur du protoplasma et rendre difficile la diffusion du galactose. En faveur de cette hypothèse, je citerai l'expérience suivante : Sur une levure acclimatée je mets 5 c. c. d'une solution de glucose à 10 0/0 et, la fermentation terminée, je soutire le liquide fermenté et lave la levure à l'eau distillée. J'introduis sur la levure, à la suite de ce lavage, une solution de galactose avec un excès de toluène ; dans un autre tube traité de la même manière j'introduis une solution de glucose avec également un excès de toluène. Je dose l'acide carbonique dégagé et j'obtiens les résultats suivants :

	CO^2 dégagé à 0° et à 760° m/m
Tube renfermant solution de glucose	4 c. c. 7
— — galactose	0 c. c. 8

Cette différence ne peut guère s'expliquer que par la difficulté de la diffusion du galactose dans un protoplasma ainsi vieilli.

En résumé, le toluène, comme l'acide borique, empêche l'accoutumance des levures, mais son action s'exerce également sur la zymase, dont il facilite la destruction, surtout si la levure

n'est pas acclimatée, et dans des conditions spéciales définies dans ce paragraphe.

Son action s'exerce encore sur le protoplasma quand il est mélangé à l'alcool. La mort de la cellule survient alors très rapidement.

SUBSTANCES AGISSANT SUR LA FERMENTATION DU GALACTOSE. — Étudions maintenant certains corps qui sont sans influence sur l'acclimatation des cellules, mais dont l'action peut être plus nuisible dans le cas d'une fermentation de galactose que dans celui d'une fermentation de glucose. Parmi celles-ci, je citerai pour commencer les acides.

Influence de l'acide malique. — Je cite le cas de l'acide malique, ayant déjà parlé au chapitre II de l'influence de l'acide tartrique.

Si on fait agir une *levure en masse,* accoutumée ou non au galactose, sur une solution de galactose ou de glucose, additionnée d'acide malique, on constate au bout d'un temps plus ou moins long, suivant que la levure est ou non acclimatée, un dégagement gazeux, qui cesse assez vite quand la levure agit sur le galactose.

Voici en effet quelques chiffres :

Liquide introduit dans chaque tube contenant 70 milligrammes de levure non acclimatée.	Sucre fermenté en milligr.
2 c. c. Solution de glucose à 12 °/₀	240
— — de galactose à 13,2 °/₀	264
— — de glucose + 1 c. c. Sol. acide malique à 2,75 °/₀	240
— — de galactose + — — — —	204
— — de glucose + — — — 5,5 °/₀	240
— — de galactose + — — — —	101
— — de glucose + — — — 11,0 °/₀	240
— — de galactose + — — — —	29

L'action de l'acide malique est indépendante du poids de levure employé. Ainsi, au lieu de 70 milligrammes, nous faisons agir 7 milligrammes seulement [1] de levure additionnée d'acide malique. Nous trouvons comme sucre fermenté :

La levure reçoit.	Sucre fermenté en milligr.
2 c. c. Sol. de glucose à 18 °/₀ + 1 c. c. Sol. acide malique à 2,75 °/₀	366
— de galactose à 21 °/₀ + — — — —	366
— de glucose à 18 °/₀ + — — — 5,5 °/₀	360
— de galactose à 21 °/₀ + — — — —	267

1. Pour obtenir une petite quantité de levure, nous opérons ainsi : On introduit 10 c. c. d'eau de touraillons sucrée dans un tube à essai. On ensemence et, la fermentation terminée, on soutire le liquide fermenté en laissant la levure au fond du tube.

L'influence de la nature du milieu originel se fait également sentir ici. Ainsi l'action de l'acide malique sur la fermentation du galactose est plus faible quand la levure s'est développée dans un milieu riche en peptone ou en phosphate d'AzH^3.

Avec la même levure dont j'ai rapporté les résultats à la page précédente on trouve :

Levure cultivée dans l'eau de touraillons peptone 2 °/₀ additionnée de :	Sucre fermenté en milligr.
2 c. c. glucose 18 °/° + 1 c. c. acide malique à 5,5 °/₀	360
— galactose 21 °/₀ + — — —	378
Levure cultivée dans l'eau de touraillons phosphate d'AzH^3 2 °/₀ additionnée de :	**Sucre fermenté en milligr.**
2 c. c. glucose 18 °/₀ + 1 c. c. acide malique à 5,5 °/°	360
— galactose 21 °/₀ + — — —	298

Enfin nous ajouterons pour finir que le rapport

$$R = \frac{\text{vitesse fermentation du glucose}}{\text{vitesse fermentation du galactose}}$$

varie entre 1,5 à 1,7, après 24 heures de fermentation. Nous voyons encore ici que ce nombre varie peu.

En résumé, l'acide malique n'empêche pas l'accoutumance des levures au galactose, mais exerce son action sur la fermentation du galactose, action bien moins sensible quand on remplace ce sucre par du glucose.

Influence de l'alcool. — L'action de ce corps ressemble beaucoup à l'action des acides; ce n'est que par le détail que leurs actions diffèrent. Pour l'alcool le poids de levure intervient.

Déjà, au chapitre II, nous avons vu qu'une levure décomposait moins de galactose que de glucose. Cet arrêt tenait déjà à l'influence de l'alcool. Ajoutons dans des tubes, contenant 7 milligrammes environ de levure, 5 c. c. d'une solution de glucose ou de galactose additionnée de doses variables d'alcool, de façon à obtenir des concentrations de 4,4 0/0, 8.3 0/0, 13 0/0 en volume.

Avec une levure accoutumée nous avons obtenu les résultats suivants :

Chaque tube reçoit	Sucre fermenté °/₀
5 c. c. de glucose à 15,01 °/° + 4,4 °/₀ alcool.	15,01
— de galactose à 18,59 °/₀ + — —	7,52
— de glucose à 15,01 °/₀ + 8,3 °/° —	15,01
— de galactose à 18,59 °/₀ + — —	4,47
— de glucose à 15,01 °/₀ + 13,0 °/₀ —	11,41
— de galactose à 18,59 °/₀ + — —	1,30

L'alcool n'influe pas sur l'acclimatation, mais exerce une action nuisible sur la fermentation du galactose.

Son action dans ce cas pourrait tenir à une coagulation du protoplasma des cellules. Or il n'en est rien, et il semble bien que dans ces conditions l'influence de l'alcool se fasse seulement sentir sur la zymase. Si dans chaque tube ayant fait fermenter une certaine quantité de galactose on ajoute une solution de glucose additionnée d'une dose suffisante d'alcool, de façon à ne pas changer le degré alcoolique du liquide de chaque tube, on obtient une fermentation, le galactose restant inaltéré.

L'action de l'alcool sur la zymase semble comparable à l'action du maltose sur l'amylase.

L'intérieur du protoplasma était, bien entendu, très granuleux et, dans ces conditions, le galactose diffuse mal.

Cette condition serait insuffisante pour expliquer l'arrêt de la fermentation du galactose, car en augmentant la dose de levure, l'influence de l'alcool diminue.

Si, en effet, on opère avec une *levure en masse*, et qu'on fasse agir celle-ci sur une solution de glucose ou de galactose additionnée d'alcool de façon à obtenir une concentration alcoolique de 10 0/0 et 15 0/0 d'alcool, on trouve que la fermentation s'arrête pour les deux sucres quand la dose d'alcool est identique dans les deux cas.

Voici en effet les quelques résultats obtenus :

La levure reçoit	Temps mort.	Sucre fermenté °/o	Poids levure milligr.
2 c. c. Solution de glucose à 16,45 °/o	2 h.	16,45	65
— — de galactose à 13,41 °/o	2 h.	13,41	82
— — de glucose à 16,41 °/o	3 h.	16,45	84
— — de galactose à 13,41 o/°	3 h.	13,41	85
— — de glucose à 16,45 °/o	8 h.	7,95	125
— — de galactose à 13,41 °/o	8 h.	8,40	120

Il est naturel d'admettre que l'alcool exerce son action coagulante sur le protoplasma des cellules quand sa concentration atteint un certain degré, et indépendamment du poids de levure en présence, que par conséquent on ne peut attribuer à un défaut de diffusion l'arrêt de la fermentation du galactose quand, avec une dose moindre de levure, la fermentation du galactose est arrêtée pour un degré moindre d'alcool.

Si on fait agir la levure en masse aussitôt l'arrêt de la

fermentation obtenu, aucun autre sucre ne peut être décomposé par la levure. Même en évaporant l'alcool, la fermentation continue difficilement, ce qui indique une modification intérieure de la cellule.

En résumé, l'alcool agit de deux façons : sur la zymase quand il y a peu de cellules, et sur le protoplasma quand la quantité de levure est en grand excès.

Action de quelques autres corps. — Pour terminer je dirai quelques mots de deux antiseptiques puissants : le sublimé ($HgCl^2$) et l'acide phénique (C^6H^6O).

Le sublimé à faible dose est un antiseptique puissant. Empêche-t-il l'acclimatation au galactose? En opérant avec la *levure en masse*, j'ai pu me convaincre que non, et avec une levure non accoutumée la quantité de sucre était la même, que ce soit du glucose ou du galactose.

Voici quelques résultats :

Les tubes reçoivent.	Sucre fermenté °/o	Poids levure en milligr.
—	—	—
2 c. c. Sol. glucose à 22 °/o + 0gr,003 $HgCl^2$.	22,00	62
— galactose à 13,41 °/o + — —	13,41	55
— glucose à 22 °/o + 0gr,006 —	2,38	48
— galactose à 13,41 °/o + — —	2,13	57

L'acide phénique agit un peu de la même manière. Il n'entrave pas l'accoutumance.

Il est donc intéressant de faire remarquer qu'un antiseptique puissant, pouvant arrêter rapidement la fermentation et le développement des cellules, peut agir, à dose légèrement au-dessous de la dose antiseptique, avec moins d'énergie pendant le travail d'acclimatation que d'autres corps tels que l'acide borique, bien moins antiseptiques que les précédents.

Il n'y a donc aucune relation entre la puissance antiseptique et la *puissance antiacclimatante*, si on peut s'exprimer ainsi, c'est-à-dire la quantité de substance nécessaire pour empêcher l'acclimatation.

Cette observation peut avoir une certaine importance partout où se manifestent des phénomènes d'accoutumance. Ainsi, dans la lutte contre les microbes, les phagocytes doivent s'accoutumer à leurs toxines. Il peut se trouver quelques substances dans le sang qui retardent et même entravent l'acclimatation des leuco-

cytes, comme il peut se faire que l'emploi de certains antiseptiques, sans influence sur l'accoutumance aux toxines, empêche le développement du microbe, arrêtant ainsi la sécrétion de la toxine. C'est à un phénomène du même ordre qu'on peut attribuer l'action du chlorure d'iode dans la production du sérum. Peut-être trouverait-on dans cette voie un auxiliaire des sérums.

En résumé, nous avons vu dans ce chapitre que l'on pouvait classer les antiseptiques, dans le cas qui nous occupe, en quatre catégories :

1° Corps qui n'agissent que sur l'accoutumance (l'acide borique);

2° Corps qui, comme le toluène, empêchent l'acclimatation et entravent la fermentation du galactose comme du glucose;

3° Corps qui, comme l'alcool, les acides, entravent la fermentation du galactose et sont, pour ainsi dire, sans influence sur celle du glucose;

4° Corps qui, sans entraver l'accoutumance, arrêtent rapidement la fermentation alcoolique de n'importe quel sucre (sublimé, phénol, alcool sur levure en masse).

L'acclimatation d'une levure est donc le résultat d'un phénomène qui nous apparaît comme compliqué, et comme elle est empêchée par certaines substances qui n'arrêtent pas la fermentation, on pourrait croire que le travail qui s'accomplit dans l'intérieur des cellules se produit seulement dans une portion spéciale de la cellule ayant ses exigences propres.

V

LEVURES ACTIVES ET LEVURES INACTIVES [1]

Jusqu'à présent nous avons laissé de côté les levures inactives ; le moment est venu de rechercher les relations qui les unissent aux levures actives.

Les travaux de Buchner sur la zymase alcoolique rendaient inexplicable l'existence de levures inactives, et l'idée vint de croire à l'existence de plusieurs zymases. Les levures actives

1. Afin d'abréger je désignerai sous le nom de levures actives celles qui décomposent le galactose en alcool et CO^2 et inactives celles qui dans les conditions ordinaires ne décomposent pas ce sucre.

seraient aux levures inactives en présence du galactose comme les levures de lactose sont aux levures de bière inactives vis-à-vis du lactose.

Dans diverses circonstances que nous allons préciser, il est possible de transformer une levure active en une levure inactive. La réciproque est vraie d'après les expériences de M. Dubourg.

Préparons d'abord un milieu de culture très nutritif pour les levures, mais exempt le plus possible de substances hydrocarbonées qui permettent à la levure de se développer dans un tel milieu non sucré. Si on prend l'eau de touraillons, il est bon de transformer les traces d'amidon qu'elle contient en glucose au moyen d'acide acétique; on chasse ensuite cet acide en partie par évaporation. Après ce traitement on ajoute du glucose, de façon à obtenir une concentration de 0,5 0/0 de sucre, et on ensemence avec une levure active.

On se sert de ballons très larges de manière à produire une combustion à peu près complète des substances hydrocarbonées pouvant servir au développement de la levure.

On filtre le liquide au bout de 8 jours; lorsque la fermentation est terminée, on évapore au bain-marie pour chasser les acides volatils, l'alcool, ainsi qu'une partie de la glycérine.

L'extrait obtenu, redissous dans l'eau distillée, servira de milieu nutritif quand on l'additionnera de sucre.

Additionnons un tel milieu de galactose et ensemençons avec une levure active. Si l'opération a été bien faite, le galactose est absolument inattaqué par la levure, qui ne se développe pas ou d'une façon très minime. Or, avec les levures actives, nous avons déjà obtenu des résultats semblables. Il suffit de les cultiver dans un milieu riche en peptone, et, après développement, de les faire macérer en présence du toluène, ainsi que nous l'avons déjà vu au chapitre précédent. Cette comparaison ne doit pas être poussée trop loin, car nous comparons une levure jeune inactive avec une levure vieille rendue inactive par l'action du toluène. Ce sont les conditions de rajeunissement qui ne se trouvent pas dans ce milieu et qu'une trace de glucose modifie très heureusement.

Pour établir une relation plus étroite entre les levures actives et les levures inactives, employons un milieu minéral, le liquide Laurent par exemple. Certaines levures actives

se développent bien dans le milieu minéral glucosé, et non quand il est additionné de galactose. Or, les levures inactives se comportent de la même façon. Il suffit d'ajouter à ce milieu de la peptone pour obtenir une fermentation du galactose avec les levures actives.

Réciproquement une levure inactive peut être rendue active. M. Dubourg a récemment résolu ce problème en cultivant une levure inactive dans un milieu riche en azote (eau de levure à 25 0/0) additionné d'un mélange de glucose et de galactose. La levure se multiplie, fait fermenter le glucose et s'acclimate en partie au galactose.

Je dis en partie, car, en répétant dans les mêmes conditions son expérience, j'ai trouvé que la disparition du galactose dans le milieu de culture n'était pas considérable. Une telle levure *mise en masse* dans un tube et additionnée d'une solution de galactose pur ne fait guère disparaître que 2 à 3 0/0 de sucre, quantité sensible, car elle a été calculée au moyen de l'acide carbonique dégagé, mais qui indique pour la fermentation du galactose une certaine sensibilité de ces levures à l'alcool. Cette même *levure en masse*, additionnée d'une solution de glucose à 18 0/0, décompose tout ce sucre. D'après ce que nous avons vu au chapitre précédent, la quantité d'alcool eût été à peu près la même dans ces deux fermentations, si la levure avait été entièrement acclimatée au galactose.

En résumé, toutes les levures pouvant faire fermenter le glucose décomposent le galactose; mais, au point de vue de l'acclimatation, toutes les levures ont des exigences variées. Les levures inactives à ce point de vue sont les plus exigeantes.

Nous avons vu au chapitre I que l'addition de peptone diminue la sensibilité des levures à l'alcool. Or ces levures inactives nous apparaissent comme très sensibles à l'action de ce corps : aussi comprend-on fort bien l'influence de l'azote dans les expériences de M. Dubourg.

Reste à expliquer le rôle que joue le glucose dans les expériences de M. Dubourg. Le glucose est un sucre facilement assimilable par les levures, ainsi que je l'ai signalé au chapitre précédent. Par ce fait, il favorise le rajeunissement des levures.

Or, une levure rajeunie et en voie de multiplication s'acclimate facilement au galactose. L'influence d'une trace de glucose

pour rendre active une levure rendue inactive par le toluène ne peut s'expliquer qu'ainsi. Le protoplasma chez les levures inactives vieillit peut-être très rapidement; la présence du glucose est donc nécessaire pour maintenir pendant un certain temps les cellules dans un état satisfaisant de jeunesse. Nous verrons même au chapitre suivant qu'une certaine quantité de glucose peut favoriser l'accoutumance des levures.

Ceci explique encore les résultats des expériences de M. Bourquelot. En faisant agir une levure de commerce forcément vieille sur du galactose impur, le glucose présent permettait aux cellules de se rajeunir et de s'accoutumer facilement au galactose.

Le milieu nutritif qui remplace le glucose dans les expériences de MM. Tollens et Stone facilite également le bourgeonnement des cellules.

Le rapport $R = \frac{\text{vitesse de fermentation du glucose,}}{\text{vitesse de fermentation du galactose,}}$ que nous avons mesuré en répétant les expériences de M. Dubourg, a été trouvé égal à 6 au lieu de 1,6, ce qui nous permet de dire que ces levures ne sont que partiellement acclimatées au galactose.

Cette constatation résulte également de ce fait qu'une telle levure, rendue active d'après le procédé de M. Dubourg et ensemencée dans un milieu nutritif additionné seulement de galactose, ne se multiplie presque pas. En résumé, théoriquement, il n'y a pas de levures inactives.

Pratiquement, au moyen de nos milieux de culture nous pouvons faire cette séparation; aussi peut-on accepter et conserver encore cette distinction.

Mais on doit rejeter la notion de fermentation par entraînement de M. Bourquelot, car nous connaissons maintenant le rôle du glucose dans l'acclimatation de levures au glucose dans ses expériences, et nous savons que son action n'est pas celle que pensait M. Bourquelot.

VI

MÉLANGE DE DEUX SUCRES ET ACCLIMATATION

Comme nous connaissons maintenant l'influence plutôt favorable du glucose, recherchons si une levure active, cultivée en

présence d'un mélange de glucose et de galactose, est capable de s'accoutumer rapidement à ce dernier sucre.

L'intérêt qu'il y avait à résoudre cette question était de deux sortes. Au point de vue accoutumance, il permettait de se rendre compte de l'influence possible d'un sucre concurrent du galactose, influence nuisible ou utile. Au point de vue philosophique, nous désirions savoir si une cellule peut, comme les êtres supérieurs, faire preuve de prévoyance pour l'avenir en s'acclimatant rapidement afin de pas éprouver d'arrêt dans son alimentation.

Je ne rapporterai que quelques expériences suffisantes pour montrer les résultats auxquels je suis arrivé.

Mais, avant d'entrer dans la solution même du problème, nous devons établir une remarque importante qui nous permettra d'interpréter facilement et utilement les résultats trouvés.

Dumas, dans ses études sur la fermentation alcoolique, avait montré que la durée d'une fermentation était proportionnelle à la quantité de sucre dissous dans le liquide, et à peu près indépendante de la concentration de ce corps.

Les expériences de Dumas, reprises par Brown et plus récemment par J. O'Sullivan, furent confirmées par ces deux savants. Le principe de la proportionnalité de la durée de la fermentation à la quantité de sucre dissous sera désigné sous le nom de *principe de Dumas* afin d'abréger le langage.

Dans leurs expériences ces savants employaient de la levure toute développée, et la faisaient agir sur des liquides de concentrations différentes.

En opérant avec une trace de levure, et en l'ensemençant dans des milieux nutritifs, on obtient des résultats conformes au *principe de Dumas*, à la condition d'observer la précaution suivante. Une levure en se développant tend à occuper à peu près tout le fond du vase, puis fait fermenter le sucre. Or, pour que le commencement de la fermentation se fasse exactement ou à peu près au même moment dans tous les ballons, il faut que les fonds de ceux-ci soient à peu près identiques.

Voici quelques expériences qui permettent de se rendre compte de l'exactitude du principe de Dumas dans notre cas particulier.

Expérience I. — 20 c. c. d'eau de touraillons additionnée de :

Ballon A	10 °/o de glucose.
— B	7,5 °/o —
— C	5,0 °/o —

sont ensemencés avec une levure pure.

On dose au bout de 48 heures le sucre restant dans chaque ballon et on trouve comme sucre disparu :

Ballons	Sucre disparu °/o
A	4,62
B	5,04
C	4,67

Quantité à peu près identique pour chaque ballon.

Expérience II. — La même expérience répétée avec des solutions de galactose fournit des résultats semblables :

Ballons	Galactose introduit °/o	Galactose fermenté °/o
A	8,70	1,40
B	5,80	1,15
C	2,89	1,18

Expérience III. — On peut faire agir une levure sur un mélange de deux sucres dont l'un est fermentescible et l'autre non attaqué par la levure. Ici encore le *principe de Dumas* se vérifie. Voici une expérience faite avec le *S. Ludwigii.*

0/0 de sucre introduit dans chaque ballon.	0/0 sucre fermenté après 40 h.
8,65 °/o de glucose.................	2,76
5,77 °/o —	2,92
2,88 °/o —	2,58
2,88 — + 5,0 °/o maltose	2,50
5,77 — + 2,59 —	2,84
2,88 — + 7,50 galactose	2,58
5,77 — + 3,94 —	2,55
2,88 — + 5,62 lactose	2,58
5,77 — + 2,81 —	2,94

Expérience IV. — Mais, pour vérifier le *principe de Dumas*, il faut un milieu nutritif pour la levure employée.

Avec un milieu aussi médiocre qu'un milieu minéral, ce principe ne se vérifie plus. Ainsi le liquide Laurent additionné de glucose à différents degrés de concentration fournit les résultats suivants :

Sucre introduit °/o	Sucre fermenté °/o après 40 heures
10 °/o de glucose.	3,50
7,5 —	2,60
5,0 —	2,10

On peut fournir une explication de cette exception. Quand un milieu est très nutritif, l'addition de glucose à différents degrés de concentration n'augmente pas son caractère nutritif. Au contraire, un milieu médiocre se bonifie par l'addition de doses plus élevées de sucre, et dans de tels milieux la levure acquiert une activité plus grande que dans les mêmes milieux moins riches en sucre.

J'ajouterai qu'en opérant avec la zymase de Buchner, on obtient des résultats conformes au *principe de Dumas*.

Fermentation de deux sucres. — Pour étudier, à différentes époques de la fermentation, les quantités de deux sucres disparues, je me suis servi des deux méthodes usuelles. La première consistait à faire des prises à différents moments de la fermentation dans un même ballon; la deuxième revenait à analyser à divers intervalles une série de ballons semblables. Les deux méthodes sont également bonnes.

Dans les expériences que je vais rapporter, j'éviterai de citer les poids de levure. Les quelques chiffres qui suivent suffisent pour montrer que tous les ballons contiennent un poids à peu près constant de levure.

Eau de touraillons contenant		Poids de levure en milligr.	
Glucose °/o	Galactose °/o	Levure de Bruxelles.	Levure de lactose.
9,15	0	72	55
4,87	2,96	77	56
0,65	5,92	69	57

Je me suis servi de galactose pur du commerce contenant 10 0/0 de glucose. Ce dernier sucre favorise le développement de la levure et permet de récolter le même poids de levure que dans les autres ballons. Avec le galactose pur, le poids de levure serait plus élevé, ce qui rendrait le ballon non comparable avec les autres.

Expérience I. — Préparons une série de ballons contenant de l'eau de touraillons additionnée de différentes doses de galac-

tose avec un autre sucre, par exemple du glucose. Dans notre expérience les ballons contenaient :

Nos des Ballons.	Sucre introduit		Sucre total.
	Glucose %	Galactose %	
1	10,44	0	10,44
2	8,23	2,26	10,49
3	5,82	4,52	10,34
4	3,41	6,78	10,19
5	1,09	9,04	10,04

La concentration du sucre était voisine de 10 0/0 dans chaque ballon. 24 heures après l'ensemencement, nous dosons le glucose et le galactose restant comme il a été indiqué au chapitre Ier.

Nous trouvons :

Nos des Ballons	Sucre fermenté %	
	Glucose	Galactose
1	3,82	0
2	3,66	0,04
3	2,67	0,70
4	1,89	1,45
5	1,00	0,21

Traduisons ces résultats au moyen d'une courbe en portant en abscisses les proportions de sucre introduit dans chaque ballon et en ordonnées les quantités de sucre fermenté. (Fig. 1.)

On constate que la courbe représentant la quantité de galactose fermenté passe par un maximum quand, dans notre expérience, les quantités de galactose et de glucose introduites sont dans le rapport de 2 à 1. Mais nous voyons encore que la levure a pu s'accoutumer au galactose en présence du glucose. Cette levure, dans ces conditions, a donc manifesté des signes de prévoyance, et le glucose semble favoriser un peu l'accoutumance dans le ballon 4.

Le moment est venu d'appliquer ici le *principe de Dumas* à nos résultats. Nous rappellerons que dans le *principe de Dumas* on n'envisage que des sucres fermentant avec la même vitesse. Or le glucose fermente 1,6 fois plus vite que le galactose chez une levure acclimatée, et si nous voulons appliquer à la fermentation de ces deux sucres le *principe de Dumas*, il faut considérer que le galactose fermente aussi vite que le glucose. Si cela était, les quantités de galactose fermenté que nous trouverions

seraient 1,6 fois plus fortes que celles trouvées en réalité. Il faut donc multiplier par 1,6 les quantités de galactose fermenté que nous trouvons dans nos expériences, pour pouvoir appliquer le principe de Dumas.

Faisons donc la somme glucose fermenté + galactose fermenté $\times$ 1,6 = Σ ; nous trouvons en portant ces valeurs en abscisses une courbe représentée en traits interrompus qui monte rapidement pour devenir horizontale dans la majorité des ballons. Ce résultat nous indique que dans le ballon 5 la levure n'a pas eu

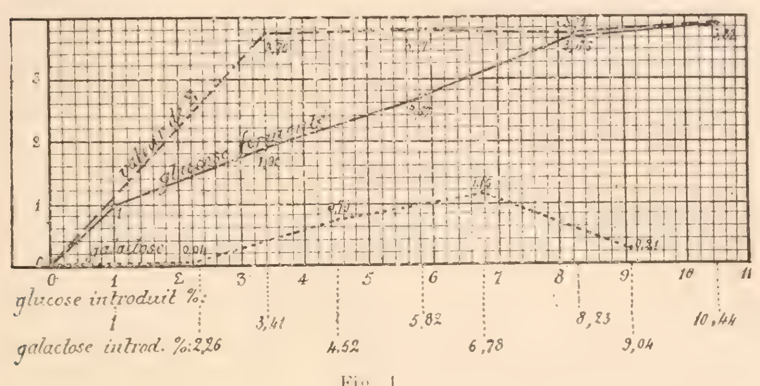


Fig. 1.

encore le temps suffisant pour s'accoutumer, tandis que dans les autres ballons la levure a pu s'accoutumer et faire fermenter le glucose et le galactose en proportions inégales, mais dont la somme Σ est à peu près constante pour tous les ballons.

Mais 48 heures après, en analysant le sucre restant, on trouve :

Nos des Ballons.	Sucre fermenté °/o	
	Glucose.	Galactose.
1	8,92	0
2	7,73	0,63
3	5,41	1,28
4	3,21	2,38
5	1,00	3,09

Les courbes obtenues avec ces résultats n'offrent plus de maximum, et la courbe de valeurs de Σ n'est plus horizontale.

En résumé, en présence de glucose, les levures peuvent s'accoutumer au galactose, ce corps favorisant même l'acclimatation pour quelques levures. J'ai de même étudié l'influence du

lévulose substitué au glucose et constaté qu'il empêchait ou retardait beaucoup l'accoutumance des levures au galactose.

Avec les levures de lactose, qui grâce à leur lactose transforment en un mélange de glucose-galactose les mélanges de glucose-lactose dans lesquels on les ensemence, l'accoutumance au galactose est très rapide dans le mélange glucose-lactose, plus rapide qu'en présence d'un mélange de glucose et galactose. La présence du glucose semble être indifférente dans ce cas.

Enfin, ce qui ressort de ce chapitre, c'est la confirmation de ce que nous avons appelé le *principe de Dumas*, et même sa généralisation dans le cas de deux sucres fermentescibles.

VII

INFLUENCE DE L'ACCLIMATATION SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES DES CELLULES

Le phénomène d'accoutumance nous apparaît déjà assez complexe. En étudiant l'action du toluène sur ce phénomème, nous nous sommes rendu compte que les cellules acclimatées s'étaient modifiées de façon à devenir moins sensibles à l'action de cet antiseptique. Pénétrons un peu plus dans l'étude des changements cellulaires qui se produisent sous l'influence de l'accoutumance, que nous allons voir être très importants.

Au chapitre IV, nous avons vu qu'une levure cultivée dans un milieu riche en peptone et mise ensuite à macérer dans l'eau additionnée de toluène perdait sa zymase. Examinée au microscope, une telle levure possède un protoplasma granuleux, indice d'un vieillissement assez accentué. Le temps que met la zymase à disparaître n'est pas le même si on opère avec une levure accoutumée ou non au galactose. Avec les premières, il faut les laisser macérer pendant 15 jours, pour quelques-unes trois semaines, en présence du toluène, tandis que, pour les secondes, au bout de 4 jours le résultat cherché est obtenu. Supposons que nous disposions de levures accoutumées ou non au galactose, mais dont la zymase a été détruite. Portons-en une trace de chacune dans l'eau de touraillons galactosée, voici ce qu'on constate :

La levure acclimatée, malgré son vieillissement certain, se rajeunit très bien; la levure non acclimatée ne peut, dans ces conditions, se développer. Comme nous l'avons déjà vu, l'addition, au milieu de culture, d'une petite quantité de glucose redonne à la levure sa vitalité en même temps qu'elle favorise son accoutumance au galactose.

Voici donc une levure qui, par suite de son acclimatation, possède la faculté qu'elle n'avait pas avant de se rajeunir dans un milieu nutritif galactosé.

Les levures inactives que nous avions acclimatées en partie au galactose, en nous servant de la méthode indiquée par M. Dubourg, ensemencées dans l'eau de touraillons galactosée, se développent très peu. Elles sont dans le même cas que des cellules vieilles actives, mais non acclimatées.

Ces constatations suffisent déjà pour nous montrer les changements profonds qu'une acclimatation à un sucre peut produire. Une nouvelle preuve résulte encore des changements survenus dans la sécrétion des diastases.

M. Duclaux a montré depuis longtemps l'influence du lait et de l'amidon sur la sécrétion de la caséase et de l'amylase chez le *Penicillium glaucum*.

Chez les levures, un tel exemple n'a jamais été fourni. Les levures, comme toutes les cellules, sécrètent un grand nombre de diastases qui ne sont pas toutes connues. On connaît encore mal les diastases protéolytiques qui doivent ramener la matière albuminoïde à l'état d'ammoniaque, comme l'amylase[1] ramène l'amidon à l'état de glucose; mais on connaît assez bien les autres diastases, telles que la sucrase, la lactase, la mélibiase, la maltase, même l'amylase, qui s'attaquent aux substances hydrocarbonées.

Si on fait agir une levure de bière, par exemple, acclimatée ou non au galactose, *mise en masse* dans un tube, sur une solution de saccharose ou de maltose, l'expérience démontre que l'activité de ces deux diastases est indépendante de l'origine de la levure. Ce qu'on exprime en disant que la sécrétion de ces deux

1. On remarquera que le terme d'amylase que j'emploie n'est pas correct, car pour ramener l'amidon à l'état de glucose, il faut trois diastases superposées : l'amylase proprement dite, la dextrinase et la maltase. Le terme amylase employé ici l'est dans un sens général.

diastases est la même chez les levures acclimatées que chez les levures non acclimatées.

La sucrase est une diastase qui dialyse très bien; nous avons répété l'expérience précédente en extrayant des levures, accoutumées ou non au galactose, la sucrase qu'elles contenaient: la quantité de sucre interverti était la même, quelle que soit l'origine de la sucrase.

On peut répéter l'expérience précédente plus facilement.

On place une *levure en masse* en présence d'une solution de saccharose et de toluène. La fermentation alcoolique dans ce cas est très lente, l'hydrolyse du saccharose est très rapide. Or les résultats trouvés par cette méthode sont conformes aux précédents.

Lactase. — M. E. Fischer a extrait des grains de képhir ou de la levure de lactose séchée un peu de lactase, diastase qui dédouble le lactose en glucose et en galactose. La lactase qu'il obtenait ainsi était peu active.

Pour extraire la lactase, j'ai employé le procédé dont M. Hill s'est servi pour ses études sur la réversibilité des diastases.

On commence par sécher la levure de lactose à 25° dans le vide en présence de SO^4H^2. La levure une fois sèche, on la pulvérise et la porte à l'étuve Gay-Lussac dont on élève la température jusqu'à 50° pendant 1 heure; puis, pendant la seconde heure, on porte à la température de 50 à 100°, qui est maintenue constante pendant 6 heures consécutives.

Pour extraire la lactase de la levure sèche, on en broie un gramme avec 10 c. c. d'eau distillée, au moyen d'un agitateur. Après avoir laissé reposer une heure, on décante le liquide qu'on filtre et qu'on additionne de toluène. On ajoute sur la levure 10 autres c. c. d'eau et on recommence le broyage comme précédemment. Le liquide est décanté et ajouté au précédent. La levure est laissée macérer pendant 24 heures dans un endroit frais en présence de 10 c. c. d'eau additionnée de toluène. Le liquide est filtré après ce temps.

On obtient environ 24 c. c. de liquide renfermant de la lactase. Ce liquide décompose le lactose en glucose et en galactose, sucres qu'on différencie comme nous le verrons.

Chauffé à 100°, il est sans action sur le lactose, la diastase ayant été tuée.

J'ai reconnu qu'on n'extrayait pas complètement la diastase des cellules par ce procédé, et, pour comparer l'activité de la lactase dans les levures accoutumées ou non au galactose, je fais directement agir la levure de lactose séchée et tuée à 100° sur la solution de lactose et en présence de toluène. Le liquide de macération m'a servi pour démontrer que la décomposition du lactose était due à un phénomène diastasique.

Après l'action de la lactase, nous avons trois sucres à différencier : le lactose inattaqué, le glucose et le galactose. La solution est divisée en trois parties égales :

Dans la première, on dose le sucre total restant au moyen de la liqueur de Fehling. On a en bloc le glucose, le galactose et le lactose dissous dans le liquide.

Dans la deuxième partie, qu'on stérilise, on ensemence la levure de bière de Bruxelles par exemple, qui attaquera le glucose et le galactose et laissera le lactose. En dosant le sucre restant, nous obtiendrons la quantité de lactose inattaqué.

Enfin, la troisième partie, stérilisée également comme la deuxième, est ensemencée avec une levure inactive comme le S. Ludwigii qui attaquera le glucose et laissera inattaqués le galactose et le lactose. Un dosage du sucre restant nous fournira le galactose et le lactose dissous dans la solution. On connaît la quantité de lactose, il est facile de déduire par différence le galactose.

Il reste à déterminer le glucose. On retranche de l'analyse du sucre de la première portion la quantité de lactose et de galactose qu'on a trouvée, et ce qui reste représente le glucose.

Avec 10 c. c. d'une solution de lactase préparée comme je l'ai indiqué plus haut, agissant sur 1 gramme de lactose, on obtient l'hydrolyse complète de ce sucre à 25° au bout de 36 heures. Les quantités de glucose et de galactose trouvées sont celles que prévoit la théorie.

En extrayant la lactase de levures ayant plusieurs origines, et en comparant l'activité de chacune d'elles, on obtient les résultats suivants :

Nº des tubes.	Origine de la levure.	Lactose hydrolysé en 24 heures.	Concentration.
A	lactose	766 milligrammes	1gr307 dans 10 c.c. eau
B	galactose	650 —	
C	glucose	180 —	

Dans ce cas, l'activité est respectivement de 4—3,5 et 1 si on prend comme unité l'activité de la diastase du tube c.

Les différences sont un peu moins considérables si on fait agir directement la levure séchée sur la solution de lactose en présence de toluène. On trouve comme résultats :

	Origine.	Lactose hydrolysé après 18 heures.
	—	—
a)	lactose	712 milligrammes.
b)	galactose	690 —
c)	glucose	350 —

L'acclimatation a donc encore comme résultat de favoriser non seulement la fermentation du galactose, mais encore d'augmenter l'activité de la lactase. En prenant encore comme unité d'activité celle du tube *c*, on trouve que dans cette dernière expérience celle-ci est respectivement de 2, 1,9 et 1 pour les tubes *a, b* et *c*.

Il est même inutile de sécher et de tuer la levure pour constater ces différences dans l'activité de la lactase. En introduisant sur une *levure en masse*, accoutumée ou non au galactose, une solution de lactose, on obtient une différence dans le commencement de la fermentation. Pour peu qu'on ait laissé la levure vieillir, la fermentation du lactose commence par les levures habituées au galactose au bout d'une demi-heure, et seulement au bout de 24 heures pour celles habituées au glucose.

Tout le monde sait qu'une levure de lactose décompose ce sucre en alcool et en acide carbonique, sans qu'on puisse déceler une trace de glucose ou de galactose dans le liquide extérieur. Or, en faisant agir la levure sèche et traitée suivant la méthode de Hill sur une solution de lactose, on constate dans la liqueur la présence d'une certaine quantité de glucose et de galactose : mais ces deux sucres ne sont pas en quantités égales. On trouve la proportion de 4,12 de glucose et de 3,54 seulement de galactose. La levure semble retenir une partie de ce dernier sucre, et ce doit être la raison pour laquelle on ne peut trouver trace de ce sucre dans le liquide de culture lactosé avant tout traitement de la levure.

Ces expériences ont toutes été faites en prenant de la levure qui s'est développée dans un milieu de culture additionnée de 2 0/0 de sucre.

En diminuant la concentration du sucre dans le milieu de culture, on constate, dans le cas du glucose, une diminution importante de l'activité de la lactase ainsi que du degré d'accoutumance de ces levures.

C'est une relation possible qui nous apparaît entre l'accoutumance et la sécrétion d'une diastase.

Voici un autre exemple : on prend une levure de lactose qu'on fait développer dans de l'eau de touraillons additionnée soit de 1 0/0 de glucose, soit de 4 0/0 de ce même sucre. La levure ainsi obtenue est *mise en masse*, et reçoit soit 2 c. c. d'une solution de lactose, soit 2 c. c. d'une solution de galactose, le tout additionné de toluène. La fermentation commence vite, mais s'arrête bientôt. On dose la quantité de CO^2 dégagé et on trouve :

					Sucre fermenté %.
Levure cultivée	dans E. T.	+ 1% glucose,	reçoit	2 c.c. sol. lactose.	0,7
—	—	+ 1%	—	2 c.c. sol. galactose.	0
—	—	+ 4%	—	2 c.c. sol. lactose.	3,00
—	—	+ 4%	—	2 c.c. sol. galactose.	0,8

Plus il y a de lactase, plus l'accoutumance au galactose est grande.

On peut encore obtenir un résultat semblable au moyen d'une expérience très délicate.

On prend une *levure de lactose en masse* habituée au glucose. On l'additionne moitié d'une solution de glucose à 1 0/0, moitié d'une solution de lactose à 1,5 0/0 et de toluène en excès. Le lendemain, la fermentation est terminée, On ajoute alors une solution de galactose qui fermente plus rapidement qu'avant l'action du lactose. Le point délicat de cette expérience est de bien noter la fin de la fermentation et de ne pas attendre trop longtemps pour ajouter le galactose, car nous avons déjà vu l'action mortelle exercée par l'alcool et le toluène sur les levures.

On peut donner à ce résultat l'explication suivante :

La levure en présence de lactose a décomposé ce sucre en glucose et galactose. Il a dû se produire en même temps une augmentation dans la sécrétion de la lactase qui a provoqué une légère accoutumance au galactose. De là les résultats obtenus.

En se reportant au chapitre précédent, nous avons vu que la

levure de lactose, en présence d'un mélange glucose-lactose et même de lactose seul, s'acclimate beaucoup plus rapidement au galactose qu'en présence du mélange glucose-galactose. Ce résultat s'explique très bien maintenant que nous savons qu'une sécrétion abondante de lactase suffit pour provoquer l'accoutumance de la levure au galactose.

En résumé nous venons de voir que l'accoutumance favorise la sécrétion de la lactase, et inversement que la sécrétion de la lactase diminue la période d'accoutumance des levures au galactose. Voici deux phénomènes qui semblent bien liés l'un à l'autre, ce qui ne doit pas être un pur hasard.

Mélibiase. Le mélibiose est un sucre qu'on obtient en traitant le raffinose (mélitriose) par les acides étendus, ou encore par la sucrase, diastase qui hydrolyse le sucre de canne.

Le dédoublement du mélibiose en glucose et en galactose peut se faire soit en traitant ce sucre par les acides concentrés, soit à la température ordinaire au moyen d'une diastase, la mélibiase. Cette diastase n'attaque pas le lactose : de même, la lactase n'attaque pas le mélibiose.

En étudiant l'influence de l'accoutumance des levures au galactose, nous sommes arrivé aux mêmes résultats au sujet de la sécrétion de la mélibiase qu'au sujet de celle de la lactase.

On prend une levure basse de Frohberg *en masse* dans un tube et habituée à différents sucres. On la laisse vieillir pendant deux jours et on ajoute ensuite 2 c. c. d'une solution de mélibiose pur[1].

Chez les levures habituées à ce sucre ou au galactose, la fermentation commence rapidement. Chez les levures habituées au glucose, elle n'a lieu dans ce cas qu'après 5 à 6 jours.

Avec une levure jeune, on constate encore une différence, faible au commencement de la fermentation, mais plus accentuée si on note le temps que met cette levure à faire disparaître 10 0/0 de sucre par exemple.

Si dans le cours de la fermentation on recherche le galactose dans le liquide, on n'en trouve pas. Je ferai remarquer que le

1. On obtient du mélibiose pur en faisant fermenter du raffinose au moyen d'une levure de bière haute. Dans ce cas le levulose provenant du dédoublement de ce sucre fermente seul et le mélibiose reste pur dans le milieu nutritif.

galactose fermente dans ce cas presque aussi vite que le glucose, et cependant les levures de bière ne sont pas comme les levures de lactose naturellement acclimatées au galactose.

Voici quelques résultats :

Origine.	Le dégagement gazeux commence après	8.08 °/₀ de mélibiose ont disparu après
Glucose.	3 heures.	15 heures.
Galactose	1/2 heure.	2 heures.
Mélibiose.	1/2 heure.	2 heures.

Des résultats absolument semblables sont obtenus en employant la levure séchée et tuée d'après la méthode de M. Hill.

L'acclimatation des levures au galactose agit donc sur la mélibiase comme sur la lactase.

Au sujet de l'influence de la sécrétion de la mélibiase sur l'accoutumance, nous pouvons citer l'expérience suivante. On fait agir 100 milligrammes de levure de Frohberg habituée au glucose sur une solution de mélibiose et sur une solution d'un mélange de glucose et de galactose. On constate que :

Solution de sucre introduite.	La fermentation a lieu au bout de
2 c.c. melibiose 8,08 °/₀	15 heures.
1c.c. glucose à 8,08 + 1 c.c. galactose 8,08.	34 heures.

L'accoutumance a été plus rapide en présence de la solution de mélibiose. En comparant l'action de ce sucre avec ce que nous savons de l'action de la lactase, nous voyons que la sécrétion de la mélibiase favorise l'accoutumance.

En résumé, chez les cellules de levures, l'activité ou encore la sécrétion de la lactase et de la mélibiase sont en rapport avec le degré d'acclimatation des levures au galactose, et réciproquement la sécrétion de la lactase ou de la mélibiase semble provoquer en partie une accoutumance des levures au galactose. C'est le moment de se souvenir que ces deux diastases agissent sur deux sucres capables de donner par hydrolyse du galactose. Cette coïncidence ne doit pas être un pur hasard, et il est probable que du moment que ces deux sucres sont proches parents du galactose, la levure capable de détruire par exemple en même temps le galactose et le lactose le fait par des moyens ayant

entre eux une relation assez étroite : l'existence de l'un est liée en partie avec celle de l'autre.

Malgré son caractère théorique, ce chapitre prévoit une conséquence pratique des résultats trouvés. Le raffinose est un sucre qui se trouve en assez grande quantité dans les mélasses. En se dédoublant il donne du lévulose et du mélibiose. Ce dernier sucre disparaît souvent très lentement. Les mélasses contiennent des substances peu favorables aux levures, et dans ces conditions celles-ci s'acclimatent difficilement au mélibiose.

En introduisant des cellules acclimatées au galactose, c'est-à-dire sécrétant déjà de la mélibiase, on obtiendrait une fermentation rapide du mélibiose, et on pourrait sauver d'une perte certaine une cuve fermentant mal.

VIII

THÉORIE DE LA FERMENTATION DU GALACTOSE. — RELATIONS ENTRE L'ACCOUTUMANCE DES LEVURES AU GALACTOSE ET CERTAINS PHÉNOMÈNES BIOLOGIQUES

Pour expliquer les faits qui précèdent, on peut faire deux hypothèses : La première, c'est d'admettre que l'accoutumance favorise la sécrétion d'une zymase spéciale au galactose; la deuxième suppose seulement une modification de la zymase existante.

L'existence d'une zymase du galactose explique bien la période d'accoutumance qu'on constate avec les levures non habituées à ce sucre, mais elle explique difficilement pourquoi les levures acclimatées feraient fermenter le glucose et le galactose avec des vitesses en rapport constant. Ces vitesses dépendent de l'activité des deux zymases qui devrait varier avec la levure. Nous avons vu qu'il n'en est rien.

Dans un mélange de deux sucres, (glucose et galactose par exemple), si l'acclimatation développait une zymase spéciale, la fermentation du glucose devrait continuer comme auparavant, et le galactose fermenterait indépendamment de l'autre sucre. Or l'expérience apprend qu'aussitôt que le galactose fermente, la fermentation du glucose diminue.

Un fait qui plaide encore en faveur de l'hypothèse d'une seule diastase est relatif à l'action du toluène sur une levure

accoutumée ou non au galactose. La zymase de la première étant moins sensible que celle de la seconde, on en déduit qu'une transformation de la zymase a pu se produire, la rendant moins sensible à l'action du toluène.

On peut à cette théorie d'une modification d'une zymase unique objecter l'action de l'alcool sur la fermentation du galactose. Tandis que l'hypothèse de deux zymases expliquerait cette action, il est plus difficile de donner une explication dans le cas d'une seule zymase. On sait fort bien que l'alcool influe sur la zymase alcoolique dans le cas de la fermentation du glucose. Il est permis de croire que l'alcool peut se comporter différemment vis-à-vis d'une même diastase agissant sur deux corps différents.

Du moment que certains corps, dits antiseptiques, entravent plus ou moins l'action d'une diastase, on peut supposer que la substance sur laquelle la diastase agit a une action, faible peut-être, mais qui peut devenir sensible en présence d'un corps antiseptique tel que l'alcool.

Nous supposerons donc que l'accoutumance a pour but de modifier la zymase alcoolique de façon à la rendre capable d'attaquer le galactose. Bien, entendu ce n'est plus la même diastase qu'avant; du moment qu'elle est modifiée, on peut très bien dire qu'il y a changement de zymase : il suffit seulement de s'entendre sur les termes de zymases différentes. J'entends par ces mots qu'il serait possible, par un procédé inconnu jusqu'ici, de séparer ces deux zymases de façon que l'une n'attaque seulement que le glucose et l'autre seulement le galactose.

L'hypothèse d'une modification dans la nature de la zymase permet, si on admet la théorie de Fischer sur la constitution des diastases, c'est-à-dire une relation entre la constitution de la diastase et le corps sur lequel elle agit, de prévoir la nature des diastases sur lesquelles l'acclimatation pourra exercer une influence. Ce seront les diastases qui agissent sur des corps ayant une certaine relation avec le galactose, comme le lactose ou le mélibiose. Ainsi que l'expérience le vérifie, ce seront les diastases comme la lactase et la mélibiase dont l'activité augmentera chez les levures accoutumées au galactose.

Relations entre l'acclimatation et certains phénomènes biologiques. — Ce travail qui a trait à l'accoutumance de cellules au galac-

tose n'est guère qu'un cas particulier du problème général de l'accoutumance. L'organisme animal est susceptible de phénomènes d'accoutumance. Les leucocytes qu'il renferme doivent s'accoutumer aux toxines, à certaines substances telles que le sulfure d'arsenic dans les expériences de Besredka, ou encore le sérum sanguin dans les expériences de Bordet.

Or, les leucocytes sécrètent des substances antitoxiques ayant les propriétés des diastases, c'est-à-dire destructibles par la chaleur. Comme pour nos levures, cette accoutumance qui constitue l'immunité est plus ou moins facile suivant l'animal et les substances que le sang renferme. Il est probable, en effet, qu'il existe, comme dans notre cas, des substances se comportant comme l'acide borique, c'est-à-dire empêchant toute accoutumance, tandis que d'autres se comportent comme le sublimé, c'est-à-dire n'empêchent pas l'accoutumance, mais seulement le développement du microbe.

L'antitoxine elle-même acclimate les leucocytes à la toxine, tout en agissant comme antidote de la toxine.

Peut-être existe-t-il encore des toxines ayant entre elles des relations de constitution comme le galactose avec le lactose ou le mélibiose, l'immunité conférée par l'une restant acquise pour les autres.

Enfin, comme je l'ai déjà signalé, la diminution de l'accoutumance concorde bien avec la disparition de l'immunité. L'absence de la toxine fait disparaître l'immunité comme l'absence de galactose fait disparaître l'accoutumance à ce sucre.

En résumé, ce travail favorisera peut-être l'étude du problème général de l'acclimatation, problème plus délicat; car on ignore même la nature de certains corps qui agissent et auxquels la cellule doit s'accoutumer. La constitution des corps peut varier, entraînant avec elle les conditions d'acclimatation de la cellule. Le problème étudié avec le galactose avait cette supériorité que ce sucre possède une composition déterminée et susceptible d'aucune variation.

Voici en peu de mots ce qui résulte de ce travail :

1). Le galactose est bien un sucre fermentescible, comme cela résultait des expériences de MM. Fischer et Thierfelder, et Bau.

2). La fermentation du galactose n'est possible que lorsque la levure s'est acclimatée à ce sucre. La durée de l'acclimatation varie avec les levures. Elle est faible pour les levures de lactose, grâce à la présence d'un peu de lactase qui provoque une légère acclimatation.

3). Chez les levures acclimatées, le glucose fermente environ 1,6 fois plus vite que le galactose.

4). Une levure acclimatée perd peu à peu son acclimatation si on lui offre un autre sucre que du galactose, du lactose ou du mélibiose. Si on favorise la multiplication, la perte de l'acclimatation se produit au bout de quelques heures.

5). L'effet de l'acclimatation est nul sur les propriétés morphologiques des levures.

6). Certaines substances empêchent l'acclimatation sans empêcher la fermentation du glucose (BoO^3, toluène).

7). L'alcool est plus nuisible à la fermentation du galactose qu'à celle des autres sucres.

8). On peut faire perdre sa zymase à une levure cultivée dans un milieu riche en peptone. Cette levure perd alors toute faculté de s'acclimater au galactose si on ne la rajeunit pas en présence de glucose. Si elle était acclimatée, elle conserve la propriété de se rajeunir directement en présence du galactose.

9). Quand on cultive une levure dans un milieu nutritif additionné de glucose et de galactose par exemple, on constate que les levures peuvent s'acclimater au galactose en présence du glucose. Cette acclimatation est difficile en présence du lévulose.

10). L'acclimatation des levures est accompagnée chez certaines levures d'une sécrétion plus grande de mélibiase ou de lactase ; la réciproque est également vraie.

11). Nous avons admis qu'il n'y a qu'une seule zymase pouvant se transformer pendant l'acclimatation, de façon à permettre la décomposition du galactose. Ce changement dans la constitution de la zymase est accompagné d'un changement dans la constitution du protoplasma.

Le phénomène de l'acclimatation est donc, dans ce cas, une modification profonde de l'état de la cellule provoquée par un hydrate de carbone très voisin du glucose.

Il doit en être de même des toxines agissant sur les leucocytes.

12). Enfin, jusqu'à nouvel ordre, la notion de fermentation par entraînement doit être considérée comme inexistante.

BIBLIOGRAPHIE

PASTEUR. Études sur la fermentation alcoolique. (*Annales de chimie et de physique*, IIIe série. No 58, page 356.)

FUDAKOWSKI. Vorläufige Mittheilung, betreffend zwei aus dem Milchzücker enstehende Zuckerarten. (*Berichte der deutsch. chemischen Gesellschaft*, VIII, page 599.)

Id. Zür näheren Kenntniss der Galactose. (*Berichte der deutsch. Chemisch. Gesellschaft*, IX, pages 42, 278 et 1602.)

Id. Zur Charakteristik der beiden näheren Milchzücker Abkömmlinge. (*Berichte der deutsch. chemischen Gesellschaft*, XI, page 1069.)

VON LIPPMANN. Ueber die Nichtidentität von Arabinose und Galaktose. (*Berichte der deutsch. chemischen Gesellschaft*, XVII, page 2238.)

KILIANI. Ueber die Identität von Arabinose und Laktose. (*Berichte der deutsch. Chemischen Gesellschaft*, XIII, page 2304).

KOCH. *Pharmaceut. Zeitung für Russland.* 25 Jahrg. 1886, nº 47, page 764.

HERZFELD. Ueber die Gährung der Galaktose.(*Rubenzückerfabrikation des deutsch. Reiches*, nº 34, page 1384.

BOURQUELOT. Sur la fermentation du galactose. (*Comptes rendus*, t. CVI, page 283.)

TOLLENS et STONE. Ueber die Gährung der Galaktose.(*Berichte der deutsch. chemischen Gesellschaft* 1886.)

A. BROWN. Influence of oxygen and Concentration on alkoholic fermentation. (*Journal Chem. Society*, 1892, page 369.)

J. O'SULLIVAN. The Rate of alkoholic Fermentation. (*Journal Society Chem. Ind.*, 1898, pages 17 et 559.)

Id. On the hydrolytic and fermentation Fonctions of yeast. (*Journal of the federated instituts of Brewing*, mars 1899.)

E. LAURENT. Nutrition hydrocarbonée et formation de glycogène chez la levure de bière. (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1889, page 113.)

E. KAYSER et BOULLANGER. Sur le glycogène des levures. (*Annales de brasserie et de distillerie*, 1898, page 73.)

CLAUTRIAU. Études chimiques sur le glycogène des champignons et de la levure. T. III. (*Mémoires couronnés par l'Académie Royale de Belgique*, 1895, page 95.)

E. SALKOWSKI. Ueber fermentative Processe in den Geweben. (*Du Bois Reymond's Archiv.*, 1890, page 554.)

F. HESSENLAND. Ueber die Zusammensetzung des Hefegummis. (*Zeitschr. des Ver. f. die Rubenzücker-industrie des deustch. Reiches*, Bd. 42, A. 1892, p. 671.)

O'SULLIVAN. Ueber alkoholische Gährung. (*Zeitsch. fur das ges. Brauwesen*, page 605.)

E. FISCHER. Bedeutung der Stereochemie für die Physiologie. (*Zeitsch. fur physiolog. Chemie*, t. XXVI, page 60.)

A. BAU. Ueber die Vergährbarkeit der Galaktose. (*Zeitschrift fur Spiritus-Industrie*, 1896, nº 38, page 303; nº 39, page 312.)

E. FISCHER et H. THIERFELDER. Verhalten der verschiedenen Zucker gegen reine Hefen. (*Berichte der deutsch. chemischen Gesellschaft* 1894, Bd. XXVII, page 2031.)

F. VOIT. Ueber das Verhalten der Galactose beim Diabetiker. (*Zeitschrift fur Biologie*, t. XXIX, page 147.)

M. CREMER. Ueber die Umlagerungen der Zuckerarten unter dem Einflusse von Ferment und Zelle. (*Zeitschrift fur Biologie*, page 183, t. XXXI.)

Id. Demonstration des Hefeglykogenes in den Zellen und als Präparat. (*Munchener med. Wochenschrift* 1894, nº 26.)

Id. Ueber Hefe und Leberzelle. (*Munchener med. Wochenschrift* 1894, nº 22.)

NEUMANN-WENDER. Die Presshefe des Handels. (*Zeitschrift fur Nahrungsmitteluntersuchung*. 1896, nº 9 et nº 12.)

E. BUCHNER et RAPP. Alkoholische Gährung ohne Hefezellen. (*Berichte der deutsch. chemischen Gesellsch.*, t. XXXI, page 1090.)

E. DUBOURG. Fermentation des Saccharides. (*Comptes rendus*, t. CXXVIII, page 440.)

DUMAS. Recherches sur la fermentation alcoolique. (*Annales de chimie et de physique*, 1874, 5e série, t. III, page 81.)

E. FISCHER. Ueber zwei neue Hexite und die Verbindungen der mehrwerthigen Alkohol mit dem Bittermandelöl. (*Berichte d. d. chemischen Gesellsch.*, page 1525, t. XXIV.)

Id. Synthesen in der Zuckergruppe. (*Berichte d. d. chemischen Gesellsch.*, page 3230, t. XXV.)

Dr BESREDKA. Immunité vis-à-vis des composés arsénicaux. (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. XIII, page 49.)

J. BORDET. Mécanisme de l'agglutination. (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. XIII, page 225.)

Id. Agglutination et dissolution des globules rouges par le sérum (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. XIII, page 273.)

STATISTIQUE DE L'INSTITUT PASTEUR D'ALGER

Du 1er novembre 1894 au 31 décembre 1898.

Par M. le Dr TROLARD, directeur.

Depuis sa fondation l'Institut antirabique d'Alger a reçu 1,836 mordus, à savoir :

Département d'Alger	645
— de Constantine	557
— d'Oran	632
Tunisie	2
Total	1,836

En outre, 112 personnes se sont présentées pour suivre le traitement et n'ont pas été admises pour des raisons diverses.

Rangés d'après leur sexe et leur nationalité, ces 1,836 mordus se décomposent de la façon suivante :

		Alger.	Constantine.	Oran.	Tunisie.
Français	H.	284	172	248	»
—	F.	96	67	98	»
Espagnols	H.	48	18	102	»
—	F.	18	5	31	»
Autres Étrangers	H.	29	46	12	»
—	F.	17	18	11	»
Israélites indigènes	H.	9	3	9	»
—	F.	3	2	4	»
Musulmans indigènes	H.	112	193	107	2
—	F.	29	33	21	»

Dans ces nombres sont compris 21 officiers et 127 sous-officiers et soldats.

Dans la série libellée « autres étrangers » figurent 92 Italiens, 27 Maltais et 5 divers.

Le nombre total des indigents est de 1,284.

Le classement d'après le siège et la gravité des morsures est le suivant : il est établi sur le modèle des statistiques ordinaires de l'Institut Pasteur, et les mêmes lettres y ont les mêmes significations.

STATISTIQUE DU 1er NOVEMBRE 1894 AU 31 DÉCEMBRE 1899

	A			B			C		
Morsures à la tête et à la figure. simples..		1	6		36	77		24	43
multiples.		6			41			19	
Cautérisations efficaces				1			1		
Cautérisations inefficaces	2			21			12		
Pas de cautérisation	4			55			30		
Morsures aux mains. simples..		29	47		221	504		157	364
multiples.		18			273			207	
Cautérisations efficaces	2			22			19		
Cautérisations inefficaces	22			165			137		
Pas de cautérisation	23			317			208		
Morsures aux membres et au tronc. multiples..		8	24		125	310		108	367
simples.		16			185			259	
Cautérisations efficaces				7			23		
Cautérisations inefficaces	9			123			150		
Pas de cautérisation	15			180			194		
Habits déchirés	16			189			201		
Morsures à nu	8			121			166		
Morsures multiples en divers points du corps.		3	3		46	46		45	45
Cautérisations efficaces							3		
Cautérisations inefficaces	1			18			14		
Pas de cautérisation	2			28			28		
Habits déchirés	1			15			25		
Morsures à nu	2			31			20		
TOTAUX... Français et Européens.		66	80		729	937		544	819
Indigènes		14			208			275	
TOTAL GÉNÉRAL					1.836				

Les animaux mordus ont été :

Chiens, 1669 fois; chats, 130 fois; ânes, 9 fois; chacals, 6 fois; singes, 3 fois; bœufs, 2 fois; chèvres, 2 fois; mulet, cheval, chevreau, mouton et lièvre, chacun une fois. Total : 1.836. Il y a eu en outre 10 traitements préventifs.

Sur ce total il y a eu 9 morts, soit une mortalité de 0,49 0/0.

Ces cas de mort se répartissent de la façon suivante. La première colonne de chaque catégorie donne le nombre des mordus, la seconde le nombre des morts, la troisième la mortalité pour 100.

	Morsures à la tête et à la figure.			Morsures aux mains.			Morsures aux membres et au tronc.			Morsures multiples en différents points du corps.			Totaux		
Tableau A.	6	0	0	47	1	2,13	24	0	0	3	1	33,33	80	2	2,5
Tableau B.	77	1	1,30	504	0	0	310	1	0,32	46	0	0	937	2	0,21
Tableau C	43	1	2,32	364	2	0,54	367	0	0	45	2	4,44	819	5	0.61
	126	2	0,16	1,015	3	0.29	701	1	0	94	3	3,11	1,836	9	0,49

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

14me ANNÉE AVRIL 1900 N° 4

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

UN MICROBE PATHOGÈNE POUR LES RATS

(*Mus decumanus* et *mus ratus.*)

Et son application à la destruction de ces animaux.

PAR J. DANYSZ.

(Laboratoire de microbie agricole de l'Institut Pasteur de Paris)

Depuis que Lœffler[1] a fait connaître sa découverte du *bacillus typhi murium*, qu'il a isolé d'une épidémie spontanée de souris blanches, et qu'il a appliqué avec succès à la destruction des campagnols (*M. arvicola*), plusieurs autres bactériologistes ont observé des épidémies analogues et en ont isolé des microbes, morphologiquement identiques au bacille de Lœffler, mais plus ou moins virulents pour les différents genres ou espèces des petits rongeurs.

Le *bac. typhi murium* n'était franchement pathogène que pour les souris (*M. musculus*) et pour les campagnols (*M. arvicola*). Le bacille de Laser[2] était pathogène pour le *M. agrarius*, celui de Merechkowski[3] pour les *Spermophiles*, et enfin celui de Issatchenko[4] pour les rats blancs.

De plus, chacun de ces divers bacilles passe par des virulences fort variables, de sorte que leur utilisation pratique pour la destruction des catégories de rongeurs auxquelles ils s'attaquent a rencontré de nombreuses difficultés. Il y aurait évidemment un grand intérêt, d'abord à étendre le champ d'action de l'un

1. *Centralbl. für Bakteriol.* 1892, nos 1 et 5.
2. *Ibid.* — 1892, p. 184
3. *Ibid.* — Bd. XVII, p. 742.
4. *Ibid.* — Bd. XXIII, p. 873.

d'entre eux, en augmentant sa virulence et en le rendant ainsi capable de s'attaquer à d'autres espèces de rongeurs : puis, cette virulence augmentée, à la maintenir au niveau atteint. J'ai essayé de résoudre ce problème, et voici à quoi j'ai abouti jusqu'ici.

Un cocco-bacille présentant l'ensemble des caractères du *B. coli* et ressemblant en cela au bacille de Lœffler, isolé par moi d'une épidémie spontanée des campagnols, s'est montré dès l'origine un peu pathogène pour le rat gris (*M. decumanus.*)

Sur 10 individus nourris avec une culture de ce microbe, il en mourait, en moyenne, deux ou trois ; quelques autres devenaient malades, mais guérissaient; d'autres enfin semblaient complètement réfractaires.

Le fait que, sur un certain nombre d'individus nourris avec ces cultures, il y en avait toujours un certain nombre qui succombaient, permettait d'espérer qu'il serait possible d'exagérer la virulence du microbe par les méthodes généralement usitées, c'est-à-dire par un certain nombre de passages de rat à rat.

Toutefois, un grand nombre d'expériences exécutées dans ce but ont montré bientôt que les passages successifs de rat à rat, aussi bien par ingestion que par injection sous la peau, finissaient toujours par affaiblir au lieu d'exalter la virulence du microbe donné par ingestion. On constatait toujours que, si la culture d'un premier passage tuait les animaux en 7 à 12 jours, et si le 2e ou le 3e passage se montraient généralement un peu plus virulents et tuaient en 5 à 10 jours, les cultures des passages suivants devenaient régulièrement de moins en moins pathogènes et finissaient toujours par ne plus tuer du tout.

Il était bien rarement possible de dépasser le 10e ou 12e passage : quelquefois la série s'arrêtait déjà au 5e passage, ou même plus tôt, par la survie de tous les animaux mis en expérience.

Le résultat était exactement le même si, au lieu de faire alterner chaque passage par l'animal par une culture en bouillon ou sur gélose, on faisait manger aux animaux d'un passage les cadavres de ceux d'un passage précédent.

Il était donc certain que, dans l'évolution d'une épidémie causée par ce microbe, il fallait tenir compte, pour expliquer son extinction, non seulement de la résistance naturelle des

survivants, mais aussi d'une diminution indiscutable de la virulence du microbe.

L'expérience suivante en donne une preuve directe :

Un lot de 30 souris normales est placé dans une grande cage avec deux souris malades, un autre lot de 30 souris est réparti dans 6 bocaux différents et nourris avec la même culture que les 20 souris placées ensemble dans la cage avec les 30 normales.

Dans les 6 bocaux, toutes les souris sont mortes en 4 à 6 jours; dans la cage, l'épidémie s'est déclarée 3 jours après la mort des deux premières souris malades, dont les cadavres ont été dévorés. Cette épidémie a duré 23 jours, 27 souris sont mortes, 3 ont survécu dans cette expérience, mais elles ont succombé un mois plus tard à la suite de l'ingestion d'une culture de virulence moyenne.

Ces trois souris n'étaient donc ni complètement réfractaires ni immunisées, leur résistance dans la première expérience ne peut être expliquée que par l'affaiblissement de la virulence du microbe dans la cage.

Comme le microbe est très peu toxique et ne tue qu'après avoir passé de l'intestin dans l'organisme où il finit par pulluler, il a semblé tout indiqué de chercher la principale cause de cet affaiblissement de virulence dans les changements des milieux que le microbe trouvait alternativement dans le tube digestif et dans le sang, et auxquels il devait s'habituer successivement en passant d'un animal à un autre.

Et, en effet, on observe d'une façon constante, d'une part qu'une augmentation de virulence pour le sang et les organes, obtenue par une longue série d'injections sous la peau, coïncide avec une diminution notable de la virulence du microbe de ces passages, pour le tube digestif; d'autre part, on constate d'une façon tout aussi régulière que les microbes isolés du sang ou de la rate d'un animal, au moment où ils commencent à passer de l'intestin dans le sang, se montrent toujours plus virulents par ingestion que ceux que l'on isole après la mort de l'animal, c'est-à-dire après une culture plus ou moins longue dans les humeurs de l'organisme.

Il est à noter, enfin, que les passages des cultures en sacs de collodion enfermés dans le péritoine des rats, faites, soit en séries ininterrompues de sac à sac, soit en faisant alterner

chaque culture en sac par une culture en bouillon ou sur gélose, aboutissaient invariablement à un affaiblissement notable de la virulence pour le tube digestif.

Augmentation de la virulence et sa conservation. — M'inspirant des observations qui précèdent, et ayant constaté qu'un virus qui tuait les souris en 4 à 6 jours commençait à passer de l'intestin dans le sang et s'accumulait surtout dans la rate déjà 24 heures après l'ingestion, j'ai réussi à augmenter sa virulence et à le rendre régulièrement pathogène pour les rats, en suivant la méthode suivante :

Une culture en bouillon, isolée du sang d'une souris sacrifiée 24 heures après l'ingestion d'un virus mortel en 4 à 5 jours, est laissée 24 heures à l'étuve, réensemencée dans un nouveau bouillon et distribuée dans des ampoules aussi complètement remplies que possible.

Les ampoules sont tenues d'abord à l'étuve jusqu'au développement de la culture, et ensuite à la température ordinaire, jusqu'à formation d'un dépôt et clarification complète du bouillon, ce qui peut durer 4 à 5 jours et a pour but d'habituer le microbe à une vie sans air.

De l'ampoule on fait passer la culture dans un sac en collodion que l'on enferme pour 24 à 36 heures dans la cavité abdominale d'un rat, puis on la fait passer de nouveau dans du bouillon ordinaire, et de là encore dans des ampoules.

La culture de ces dernières ampoules est ensemencée sur gélose, et c'est cette culture sur gélose que l'on donne, de nouveau, à manger aux souris, après l'avoir délayée dans l'eau et après en avoir imbibé du pain ou du grain.

On recommence plusieurs fois cette série d'opérations, et on constate déjà au quatrième ou cinquième de ces passages une augmentation de virulence très appréciable. Les souris, qui ne mouraient au début qu'en 4 à 7 jours, meurent 36 à 60 heures après l'ingestion.

Quand on a obtenu un tel résultat, on peut alors remplacer les souris par des rats blancs, en commençant par des jeunes rats âgés d'un mois à six semaines, et on continue les passages en prenant des rats de plus en plus âgés.

En procédant ainsi, et en faisant des cultures en sacs dans les cavités abdominales des espèces que l'on veut atteindre, on

peut spécialiser la culture et la rendre suffisamment virulente par une dizaine de passages.

C'est en opérant de cette façon que j'ai réussi à rendre régulièrement virulente d'abord pour les rats gris (*M. decumanus*), ensuite pour les rats noirs (*M. ratus*), et enfin pour le rat blanc, une culture qui à l'origine était très peu pathogène pour le rat gris et complètement inoffensive pour les deux autres.

Le bouillon dont je me suis servi est un bouillon de viande de cheval, peptonisé à 1 0/0, et additionné d'un peu de carbonate de chaux pour neutraliser les acides qui se forment pendant la culture et qui affaiblissent rapidement la virulence du microbe.

Enfermées dans des ampoules, à l'abri de l'air et de la lumière, ces cultures conservent leur virulence pendant plusieurs mois. Ensemencées sur gélose, elles se conservent sans variations appréciables pendant un à deux mois; en bouillon, dans des tubes ou flacons fermés avec du coton, elles s'altèrent très rapidement.

Ce sont ces cultures, relativement stables, que j'ai essayé d'employer pour la destruction en grand des rats dans les égouts et dans tous les locaux qu'ils infestent. Comme je l'ai dit plus haut, pour le développement des épidémies sur une population animale, il y a deux termes : le microbe pathogène et l'espèce dans laquelle il doit se propager. Nous savons que les diverses espèces de rats ne se ressemblent pas. On a vu aussi que les propriétés d'une même espèce de rats ne sont pas partout les mêmes, et dépendent dans une certaine mesure de leurs conditions d'alimentation. La question était de savoir quelle proportion de succès ou d'insuccès pouvait provenir de toutes ces causes de variation encore mal étudiées : il fallait consulter pour cela l'expérience.

Application dans la pratique. Résultats obtenus. — Les cultures amenées peu à peu à un degré de virulence permettant de tuer par ingestion tous les rats tenus en cage, au laboratoire, en 5 à 12 jours, ont servi en même temps à un grand nombre d'essais pratiques dans les fermes, magasins et autres locaux infestés par les rats.

De l'ensemble des rapports, se chiffrant par quelques centaines, que j'ai reçues à ce sujet, il résulte que, dans 50 cas sur 100, on constatait une disparition complète des rats, dans 20 cas

les résultats semblaient complètement négatifs, dans les 30 autres cas on constatait une diminution sensible des rongeurs dans les locaux traités.

Dans certains cas, assez rares, on a pu suivre l'extension de l'épidémie de la localité traitée à un certain nombre de localités voisines, non traitées.

Des observations de cet ordre sont intéressantes, mais elles ne permettent guère d'apprécier avec précision les effets réels de l'intervention. — Le nombre des malades et des cadavres que l'on trouve à découvert est relativement toujours très petit, et il est impossible de savoir si les rats disparus ont succombé à la maladie ou ont simplement émigré, fuyant devant l'épidémie.

Aussi, quand le service sanitaire de Paris s'est adressé à l'Institut Pasteur pour savoir s'il était possible de détruire les rats d'égouts au moyen d'une maladie contagieuse, j'ai cru qu'il fallait, avant de répondre, soumettre cette question à une étude spéciale.

J'ai demandé à l'ingénieur en chef, M. Bechmann, et à MM. les inspecteurs des égouts Masson et Delphini, de mettre à ma disposition un tronçon d'égout clôturé de tous les côtés, de façon que les rats ne puissent pas s'en échapper, abondamment fourni de paille et de nourriture, et d'introduire dans cet égout un nombre déterminé de rats vivants et bien portants pris dans des égouts voisins.

Ces conditions ayant été réalisées dans un tronçon d'égout de 160 mètres de long sur 3 mètres de large, l'expérience a donné les résultats suivants :

Le 2 février, 200 rats gris brun (*M. decumanus*) furent lâchés dans l'égout et laissés en observation pendant 10 jours.

Le 12 février, l'égout fut visité avec soin, tous les rats semblaient bien portants, on n'a trouvé aucun cadavre.

Le même jour on a distribué dans l'égout 20 tubes de culture sur du pain coupé en petits morceaux.

L'épidémie s'est déclarée le 20 février et on a fait alors une deuxième distribution de culture virulente.

Jusqu'au 2 mars l'égout fut visité chaque jour. On a trouvé en tout 80 cadavres de rats dont 40 furent autopsiés, les autres laissés sur place.

Les premiers ont montré tous, sans exception, des lésions

caractéristiques de la maladie (congestion de l'intestin. hypertrophie de la rate), et contenaient des cultures pures dans le sang; les rats laissés sur place ont toujours été dévorés du jour au lendemain par les survivants.

Le 2 mars, on n'a pu découvrir, malgré les recherches les plus minutieuses, qu'une grande quantité de débris informes ne permettant pas d'évaluer le nombre de rats dévorés, et 8 rats vivants qui ont fini par s'échapper par suite d'une négligence du surveillant.

Bien que l'expérience n'ait pu être suivie jusqu'à la fin, elle n'en montre pas moins d'une façon certaine que les rats en liberté dans les égouts mangent toujours très volontiers le pain trempé dans du bouillon de culture, malgré l'abondance d'autre nourriture (blé et carottes), qu'ils prennent la maladie et y succombent en grand nombre, et que les survivants dévorent les cadavres.

Il est donc très possible de créer à l'aide de cette culture des épidémies qui se propageront dans une certaine mesure.

La propagation de l'épidémie sera probablement assez limitée, elle s'arrêtera au 3e ou 4e passage par l'affaiblissement de la virulence du microbe, constaté toujours dans nos expériences relatées plus haut, et aussi par suite de la résistance plus grande d'un certain nombre des survivants. — Aussi, quand on veut détruire la grande majorité des rats qui infestent une localité, faut-il distribuer les cultures à plusieurs reprises, à 10 ou 12 jours d'intervalle, c'est-à-dire au moment où la distribution précédente aura déjà produit son effet.

L'époque de l'année à laquelle on doit de préférence appliquer ce traitement n'est pas non plus indifférente. Les jeunes rats sont beaucoup plus sensibles à l'action du virus que les rats âgés, les épidémies seront donc plus meurtrières au printemps (avril-mai-juin) et en automne (septembre à décembre) qu'aux autres époques de l'année.

En détruisant systématiquement, pendant une ou deux années de suite, les jeunes générations qui succombent toujours infailliblement, on finirait certainement par détruire les rats d'une façon complète.

Les expériences et essais faits simultanément à Lille par M. Calmette, directeur de l'Institut Pasteur de Lille; à Hambourg

par M. Abel, médecin sanitaire; à Copenhague par M. Th. Madsen; et à Tunis par M. Loir, directeur de la station bactériologique, ont donné à peu près les mêmes résultats qu'à Paris.

Les rats en cage ont toujours succombé 8 à 12 jours après une ingestion d'une culture, la grande majorité des essais en grand ont eu pour résultat une disparition plus ou moins complète des rats.

Le rapport que M. le Dr Abel a eu l'obligeance de m'adresser mérite d'être cité en entier.

« 1° *Expérience de laboratoire.* — Quelques rats blancs et quelques rats gris brun capturés dans les égouts de Hambourg, enfermés dans des cages et nourris avec une culture reçue de l'Institut Pasteur de Paris, ont succombé en 6 à 12 jours. — A l'autopsie, — résultats positifs. »

M. Abel a isolé une culture de cette première expérience, et c'est avec cette culture réensemencée par lui qu'il a fait les deux essais suivants :

« 2° *Station de désinfection à Hambourg.* — 10 cultures sur gélose.

« Résultats d'abord peu encourageants, on n'a trouvé que quelques souris mortes. Plus tard, sans trouver de rats morts, on a constaté une diminution de leur nombre.

« 3° *Grand bateau à vapeur* (route d'Afrique orientale) 10 tubes de culture sur gélose.

« Aucun effet n'a été constaté. On n'a trouvé ni rats morts ni une diminution appréciable.

« Il n'y avait pas de souris sur le bateau. »

J'ai prié alors M. Abel de faire quelques nouveaux essais avec des cultures préparées à Paris et toutes prêtes à être employées.

« 4° *Magasin d'entrepôt.* — 30 tubes de culture sur gélose.

« Quelques jours après la distribution on a trouvé un rat et deux souris mortes. — L'examen bactériologique a donné ses resultats positifs. Le douanier surveillant m'informe que le nombre de rats est plus restreint qu'avant l'emploi des cultures.

« 5° *Grande écurie d'un voiturier*, beaucoup de rats et de souris. 50 tubes de culture sur gélose.

« Résultat excellent. Un rat noir (*M. ratus*) et une souris trouvés morts. Dans les cadavres examinés par moi, votre bacille a été trouvé en abondance. Lésions anatomiques typiques (tuméfaction des glandes de Peyer, hypertrophie de la rate, taches grises nécrotiques multiples dans le foie). On n'a pas trouvé d'autres cadavres, mais les rongeurs ont disparu complètement. Impossible de savoir s'ils sont morts ou s'ils ont émigré.

« 6° *Petit hangar de la station de désinfection à Cuxhaven.* — Dix tubes de cultures sur gélose.

« Effet nul.

« Certainement, dit M. Abel, il n'est pas facile d'apprécier pourquoi les résultats avaient été si différents. Il me semble bien possible que ces différences dans les résultats obtenus sont dues en partie à la quantité des cultures employées, mais je ne puis pas en donner une preuve évidente.

« Il n'y a pas de doutes que la méthode donnera des résultats satisfaisants dans des conditions convenables, mais il est difficile de connaître ces conditions. »

Dans les chapitres précédents, j'ai déjà essayé de préciser les conditions qui me semblent les plus favorables pour le développement d'une épidémie parmi les rats, je n'y reviendrai donc pas ; j'ajouterai seulement que, pour chaque localité d'une certaine importance, la destruction des rats devrait faire l'objet d'une étude spéciale.

Les applications en grand devraient toujours être précédées de quelques expériences de laboratoire ayant pour but de montrer si la culture est pathogène pour la race des rats qu'il s'agit de détruire.

Dans l'affirmative, il serait toujours bon de renouveler et de spécialiser un peu la virulence de la culture, et c'est alors seulement qu'il faudrait l'appliquer d'une façon méthodique, aux époques où les jeunes générations des rats commencent à se montrer.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

SUR LE CHARBON SYMPTOMATIQUE

Par MM. E. LECLAINCHE et H. VALLÉE,

de l'École vétérinaire de Toulouse.

L'étude bactériologique du charbon symptomatique a fait déjà l'objet d'importants travaux.

En 1876, Bollinger[1], puis Feser[2] signalent la présence de bâtonnets mobiles dans les tumeurs crépitantes d'une affection « prétendue charbonneuse », mais différenciée déjà par la clinique du charbon bactéridien, en raison de ses caractères particuliers ; tous deux concluent à la spécificité des microbes rencontrés, et ils obtiennent la transmission au bœuf et au mouton par l'inoculation des produits organiques virulents. En 1879, Arloing, Cornevin et Thomas précisent expérimentalement la distinction de la fièvre charbonneuse et du charbon emphysémateux ; en 1880, ils indiquent les principaux caractères de la bactérie pathogène (*Bacterium Chauvœi*) et ils signalent un premier procédé d'immunisation ; jusqu'en 1884, Arloing et Cornevin poursuivent l'étude de la maladie et ils font connaître une méthode de vaccination partout répandue à l'heure actuelle[3].

Dès 1887, E. Roux[4] obtient des cultures pures par l'ensemencement, dans le vide, sur gélose et en bouillon de veau.

Kitasato[5] entreprend, en 1889, l'étude du *Bacterium Chau-*

1. Bollinger, Zur Kenntniss des sog. Geräusches, einer angeblichen Milzbrandorm. (*Deutsche Zeitschrift für Thiermedicin*, t. I, 1875, p. 297.)

2. Feser, Studien ueber den sogenannten Rauschbrand des Rindes. (*Zeitschrift für prakt. Veterinärwiss.* t. IV, 1876, p. 13.)

3. Ces travaux sont réunis et complétés dans l'ouvrage suivant Arloing, Cornevin et Thomas. *Le charbon symptomatique du bœuf*, 2e édition, 1887.

4. E. Roux, Sur la culture des microbes anaérobies. (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. I, 1887, p. 62.)

5. Kitasato, Ueber den Rauschbrandbacillus und sein Culturverfahren (*Zeitschrift für Hygiene*, t. VI, 188, p. 1057) ; Ueber das Wachsthum des Rauschbrandbacillus in festen Nährsubstraten. (*Id.*, t. VIII, 1890, p. 55.)

vivi ; il réalise la culture sur différents milieux et il analyse les propriétés biologiques du bacille et de la spore.

En 1888, E. Roux[1] démontre à la fois le rôle de la toxine dans la pathogénie et la possibilité de conférer l'immunité par l'inoculation de substances solubles.

Duenschmann[2] tente un peu plus tard de poursuivre cette étude ; il signale les propriétés immunisantes du sérum fourni par les animaux rendus réfractaires à l'action du virus.

Enfin Kitt[3] rapporte divers résultats concernant à la fois la culture de la bactérie, l'atténuation de la virulence et l'obtention de sérums immunisants.

Tous ces travaux ont éclairé puissamment déjà l'étude de la maladie ; mais, en même temps que les connaissances devenaient plus précises, les incertitudes apparaissaient plus nombreuses et les contradictions devenaient plus évidentes. En ce qui concerne seulement des faits d'observation directe, comme les conditions de la culture de la bactérie ou la résistance du virus, les données publiées sont déja dissemblables. D'autre part, les circonstances étiogéniques de la maladie ne sont que très imparfaitement connues.

En abordant à nouveau ce sujet, nous nous sommes proposés de reviser l'étude bactériologique du microbe et d'analyser le rôle respectif de la bactérie et de la toxine dans l'étiologie de l'infection.

PREMIÈRE PARTIE

LA BACTÉRIE DU CHARBON SYMPTOMATIQUE

Le virus que nous avons utilisé provient directement des lésions musculaires provoquées chez les bovidés par l'évolution accidentelle du charbon. Quatre virus de sources différentes se

1. E. Roux, Immunité contre le charbon symptomatique conférée par des substances solubles. (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. II, 1888, p. 49.)

2. Duenschmann, Etude expérimentale sur le charbon symptomatique. (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. VIII, 1894, p. 403.)

3. Kitt, Die Züchtung des Rauschbrandbacillus bei Luftzutritt (*Centralblatt für Bakter.*, t. XVIII, 1895, p. 168) ; Ueber Abschwächung des Rauschbrandvirus durch strömende Wasserdämpfe (*Id.*, t. III, 1888, p. 572 et 605) ; Serumimpfung gegen Rauschbrand (*Monatsehfte für Thierheilkunde*, t. XI, 1899, p. 49).

sont comportés de façon identique et ont été indifféremment employés.

Il est difficile d'obtenir des cultures pures du bacterium Chauvœi. — La pulpe recueillie dans les tumeurs du charbon accidentel renferme presque toujours des microbes étrangers ; certaines d'entre les formes associées sont des anaérobies facultatifs sporulés que l'ensemencement à l'abri de l'air ou le chauffage ne parviennent point à éliminer. D'un autre côté, le virus ne peut être entretenu dans le laboratoire que par des passages de cobaye à cobaye et une nouvelle difficulté se présente :

L'infection par le charbon symptomatique favorise à un haut degré l'envahissement des tissus par le vibrion septique ; au moment même de la mort, la présence du vibrion est extrêmement fréquente, non seulement dans les tumeurs, mais encore dans le sang et dans tous les milieux. L'expérience nous a montré maintes fois qu'il est difficile d'obtenir une longue série de passages directs de cobaye à cobaye ; le plus souvent une souillure par le septique se produit et, après quelques passages, les animaux meurent à la fois septiques et charbonneux.

Après quelques passages successifs par le cobaye, il convient d'éprouver le virus par l'inoculation simultanément au lapin et au cobaye. Quand le cobaye seul est tué, on ensemence directement quatre ou cinq gouttes de sang recueilli dans le cœur aussitôt après la mort.

La bactérie est strictement anaérobie. — Kitt n'a obtenu la culture qu'en plaçant le microbe dans des conditions de vie anaérobie, telles que les réalise l'ensemencement sous une haute colonne liquide, en grande partie purgée d'air par le chauffage.

Kitasato opère sous une atmosphère d'hydrogène. Nous préférons cultiver dans le vide. Les tubes en U de Pasteur chargés de bouillon ensemencé sont soumis à l'action d'une trompe métallique puissante, rincés à plusieurs reprises avec l'hydrogène ou le gaz d'éclairage purifié et scellés à la lampe sous le vide.

Milieux de culture. — Les bouillons de veau ou de poulet, additionnés de glycérine et de sulfate de fer, ou d'acide lactique, recommandés daus leur mémoire de 1887, par Arloing et Cornevin, n'ont donné aucune culture à Kitasato, sous atmosphère

d'acide carbonique ou d'hydrogène. En opérant dans le vide, avec des bouillons de veau additionnés de quantités croissantes de glycérine (2 à 5 0/0) et de sulfate de fer (1 à 10 0/00), en variant le degré d'alcalinité des milieux, nous n'avons constaté nous-même aucun développement.

Dans son premier mémoire, Kitasato montre que les milieux liquides conviennent le mieux pour la culture; il emploie de préférence les bouillons de cobaye, de veau, de lapin, de poule ou le bouillon de bœuf préparé avec de la viande fraîche; l'addition de sucre ou de glycérine n'exerce aucune action favorisante ; si l'on veut conserver des cultures actives, il est indispensable de réensemencer chaque semaine en bouillon frais. Nos observations confirment tous ces points; nous avons constaté notamment que les cultures en bouillon de veau peptonisé à 1 0/0 restent assez pauvres et qu'elles perdent vite leur virulence.

Il est cependant nécessaire pour l'étude du charbon de posséder des cultures à la fois virulentes et toxiques : déjà Duenschmann s'était efforcé de trouver des milieux plus favorables. Le bouillon Martin [1], stérilisé par filtration, présente tous les avantages désirables. La culture s'opère avec une remarquable abondance : après 12 à 15 heures, le liquide est fortement troublé et de fines bulles gazeuses montent sans cesse à la surface; après 24 heures, le bouillon est complètement opaque, et l'on distingue, par l'agitation, d'innombrables petits flocons blanchâtres, tandis que le dégagement gazeux s'opère avec intensité; après 36-48 heures, un dépôt blanc, grumeleux, occupe le fond des tubes, et le liquide est redevenu limpide.

Examinée après 12 heures, sans coloration, la culture montre de très nombreux bâtonnets mobiles, courts et de longueur égale. A ce moment déjà, on rencontre des bactéries déformées par la spore en fuseau ou en raquette. Après trois jours, on ne trouve plus guère que des formes sporulées. Après huit jours, le dépôt contient, avec de très rares bâtonnets, une quantité considérable de spores. Dès la 48e heure, la culture est franche-

1. Nous utilisons le mélange à parties égales de la solution de peptone d'estomac de porc et du liquide de macération de viande de veau. (L. Martin, ces *Annales*, 25 janvier 1898, p. 26.)

ment acide et cette réaction se conserve ensuite indéfiniment.

Les cultures en bouillon Martin conservent leur virulence beaucoup plus longtemps que celles qui sont faites dans les bouillons ordinaires.

Exp. — Le même virus est ensemencé simultanément en bouillon-veau-peptone et en bouillon Martin. Après 15 jours, les cultures sont inoculées, en même temps, à des cobayes de poids égaux, à la dose de 1 c. c. La culture en bouillon de veau ne détermine qu'une réaction locale insignifiante. La culture en bouillon Martin provoque une tuméfaction crépitante, envahissante, et la mort en 40 heures.

La toxicité des cultures en bouillon Martin est supérieure de beaucoup à celle des autres. Alors que des filtrats en bouillon de veau ne tuent pas le cobaye à la dose de 20 c. c., nous avons obtenu, avec les cultures en bouillon Martin, des filtrats tuant le cobaye à la dose de 5 c. c. par injection dans le péritoine.

Morphologie. — Dans les tumeurs développées chez le cobaye au point d'inoculation, sont les bacilles, sporulés ou non suivant que l'evolution a été plus ou moins rapide. On s'explique que Kitasato ait pu nier la formation de la spore dans l'organisme. Chez des animaux tués très rapidement, la spore réfringente peut faire défaut : on trouve seulement, avec les bâtonnets réguliers, des formes ovales, fixant également la matière colorante dans toute leur masse. Dans l'évolution habituelle, au contraire, les formes sporulées abondent dans les muscles envahis, mais la sérosité recueillie dans leur voisinage ne contient généralement que des formes bacillaires ou renflées, dépourvues de spores.

Les séreuses renferment des formes droites, moins trapues que celles des tumeurs, quelquefois réunies bout à bout, au nombre de trois ou quatre articles *de longueur égale*. Ces formes sont asporulées ; le chauffage des sérosités à 70°, pendant une demi-heure, les stérilise dans presque tous les cas.

Dans les cultures, on retrouve à la fois des bâtonnets réguliers et des bactéries diversement déformées par la spore réfringente.

Le *bacterium Chauvæi* prend assez mal les couleurs d'aniline en solution aqueuse : au contraire, il fixe avec intensité le violet phéniqué de Nicolle ; la bactérie traitée par la méthode de Gram-Nicolle reste colorée : pour la recherche dans les tissus, la déco-

loration peut être poussée assez loin, si elle est pratiquée avec soin.

ÉTUDE DE LA VIRULENCE.

Cette étude a été réalisée avec des cultures en bouillon Martin dont la pureté a été toujours soigneusement contrôlée, notamment quant à la souillure par le vibrion septique. On a eu recours, dans ce but, soit à de fréquentes inoculations d'épreuve au lapin, soit à l'immunisation préalable des cobayes de passages par un sérum immunisant à l'égard du vibrion septique. Nous insistons à nouveau sur l'association du vibrion septique au bacille du charbon symptomatique, car elle constitue la grosse difficulté de ces recherches ; la plupart des expérimentateurs ont été victimes de cette superposition. On verra quel rôle cette cause d'erreur a joué dans l'appréciation des rapports existant entre le *bacterium Chauvœi* et le vibrion septique.

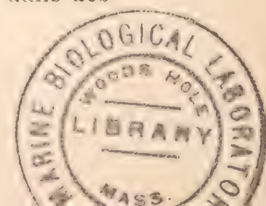
Les cultures en bouillon Martin, âgées de 1 à 5 jours, tuent en 18 à 24 heures, à la dose de 3 à 4 gouttes, par inoculation intra-musculaire ou sous-cutanée, un cobaye du poids moyen de 500 grammes. Des doses de 1/2 à 1 c. c. tuent, dans les mêmes conditions, en 12 à 15 heures. La virulence ne diminue que très lentement ensuite ; après 15 jours, le cobaye est encore tué sûrement par des doses moindres de 1 c. c.

L'inoculation intra-musculaire provoque le développement rapide de tumeurs emphysémateuses, identiques à celles qui sont consécutives à l'inoculation de sucs organiques virulents. Les cobayes meurent dans le coma, avec une hypothermie qui peut aller jusqu'au-dessous de 30° et même de 25°.

L'injection de 2-4 gouttes de culture dans le péritoine tue en 12 heures environ. Un exsudat séro-sanguinolent renferme quelques leucocytes et de nombreuses bactéries asporulées.

Le dépôt direct de 2-3 gouttes dans la masse des hémisphères cérébraux tue presque toujours en quelques heures, par intoxication directe, et avant qu'une pullulation ait eu le temps de s'opérer.

L'immunité naturelle du lapin n'est pas absolue. Certains animaux sont tués par l'injection, dans les muscles de la cuisse, de 2-4 c. c. d'une culture toxique, alors que d'autres, dans des



conditions identiques, résistent à l'épreuve. On ne peut s'expliquer ces variations que par des différences individuelles dans la réceptivité. La région inoculée est le siège d'une tumeur caractéristique; les muscles, de teinte foncée, sont livides, secs, spongieux; une sérosité gélatineuse, de couleur rouge, infiltre les interstices musculaires et le tissu conjonctif sous-cutané de la cuisse et de l'abdomen; les tissus dégagent une forte odeur acide de beurre rance. Ces lésions diffèrent totalement de celles qui expriment l'infection septique; d'ailleurs, les tissus ne renferment que des formes courtes filamenteuses ou sporulées, caractéristiques: les mêmes bactéries sont présentes sur le foie; l'inoculation des sérosités à des lapins neufs ne les tue pas, alors que les cobayes succombent à un charbon authentique. Enfin l'infection symptomatique et parfois obtenue, avec la culture, chez des lapins immunisés à l'égard du vibrion septique.

Le dépôt, dans le péritoine du lapin, de 3 c. c. d'une culture qui tue sous la peau à la même dose, laisse les sujets indifférents.

L'inoculation intra-veineuse tue en quelques heures, par intoxication: si la culture est très toxique, une dose de 2-3 c. c. tue en quelques minutes seulement. Le tableau suivant indique les résultats de quelques épreuves.

Nos	Poids des lapins.	Quantité de culture injectée.	Age des cultures.	Mort après:
1	1.800 gr.	5 c. c.	11 jours. Conservé à l'étuve dans le vide. On injecte le liquide clair décanté.	5 minutes
2	1.680 —	2 c. c. 1/2		5 —
3	1.420 —	2 —		5 heures 1/2
4	1.800 —	3 —		4 —

Les effets ne peuvent être attribués au bouillon employé pour la culture: l'expérience montre que le lapin reçoit impunément 10 et 20 c. c. de bouillon dans la veine de l'oreille.

Les accidents débutent après 5 à 6 minutes; lors de mort immédiate, l'animal rejette brusquement la tête en arrière; il tombe sur le côté; on note des hoquets, de la chorée du diaphragme, quelques cris, de l'agitation convulsive des membres; la mort survient 2 ou 3 minutes après le début des accidents. En d'autres cas, les accidents apparaissent après 6 ou 8 minutes seulement; l'on constate de la parésie, puis de la paralysie du

train postérieur, une résolution musculaire complète, de l'accélération de la respiration et de la diarrhée. Cet état persiste pendant plusieurs heures; la température s'abaisse à 35-34° et la mort arrive après 4-5 heures environ. Parfois enfin, on observe seulement de l'engourdissement, puis un état comateux de plus en plus grave et les animaux meurent après 12-24 heures, sans que des symptômes bruyants aient été relevés.

Lors d'évolution ralentie (mort après 24 heures), il existe des lésions très nettes d'intoxication : les séreuses ecchymosées renferment des exsudats séro-sanguins ; le foie est friable, de teinte jaune ; le myocarde est cuit et couvert d'ecchymoses. Les exsudats des séreuses montrent une quantité considérable de bactéries asporulées.

Ainsi, l'inoculation des cultures provoque tantôt une évolution virulente, tantôt des accidents immédiats qui ne peuvent être rapportés qu'à une intoxication rapide.

Les deux ordres d'accidents peuvent être expérimentalement dissociés : on verra que chez le cheval, animal peu sensible à l'action du virus, les cultures injectées dans les veines déterminent des symptômes d'intoxication ; d'autre part, les cobayes immunisés par le sérum à l'égard du virus restent sensibles à l'influence de la toxine.

ÉTUDE DE LA TOXICITÉ

Les expériences de Roux ont établi la faible toxicité des cultures en bouillon de veau chauffées à 115°. Les milieux albumineux de Duenschmann donnent des résultats plus satisfaisants ; ses extraits filtrés de culture en purée de viande tuent à la dose de 5. c. c.

Le bouillon Martin, ensemencé avec une bactérie très active provenant directement de l'organisme, donne une culture qui devient rapidement toxique. L'épreuve des cultures totales, non chauffées, pratiquée par l'inoculation dans la veine du lapin ou dans le cerveau du cobaye, montre que la toxicité, déjà manifeste après 48 heures, atteint son énergie maxima vers le cinquième jour, pour décroître ensuite assez rapidement.

On peut présumer des effets de la toxine par les suites immédiates de l'inoculation des cultures non filtrées, mais

simplement décantées ; il est vraisemblable que c'est la toxine qui tue en quelques minutes les lapins inoculés dans les veines. Chez le cheval aussi, l'inoculation intra-veineuse des cultures décantées provoque souvent des accidents graves, immédiats, et même la mort :

Exp. — 15. XI. 99. Cheval morveux, taille moyenne, reçoit dans la jugulaire 10 c. c. d'une culture âgée de 8 jours. Trois minutes après l'injection, tremblements généralisés, respiration haletante, chute ; mort en six minutes.

18. XI. 99. Cheval de taille moyenne, reçoit dans la jugulaire 18 c. c. d'une culture âgée de 11 jours ; après deux minutes, respiration sifflante, défécations répétées, tremblements musculaires. Les accidents persistent pendant 1/2 heure, puis ils s'atténuent et disparaissent progressivement en quelques heures.

Six jours après, le cheval reçoit 12 c. c. d'une culture âgée de 5 jours ; après 4 minutes, respiration haletante, hoquets, chute ; défécations répétées ; contractions des muscles du cou ; bâillements ; mort en 5 minutes.

La filtration seule permet d'isoler la toxine, mais les filtres retiennent une grande partie du poison, car les filtrats sont toujours notablement moins actifs que la culture entière.

Exp. I. — Un lapin de 1,800 grammes reçoit, dans la veine de l'oreille, 3 c. c. d'une culture totale de 5 jours ; il est tué en 15 heures, après avoir présenté les signes d'intoxication déjà signalés.

Un lapin de même poids reçoit 10 c. c. de la même culture après filtration ; il ne présente aucun accident.

Exp. II. — Un lapin de 1,600 grammes reçoit dans la veine 2 c. c. d'une culture de 18 heures ; état comateux après 5 à 6 minutes : diarrhée ; mort en 10 heures.

Un lapin de même poids reçoit 6 c. c. de la même culture filtrée, aucun accident.

Exp. III. — Cobaye 171 ; 970 grammes. Reçoit dans le cerveau trois gouttes d'une culture de 18 heures. Après 5 minutes, hoquets, éternuements, chute, contractions des membres, puis coma ; mort en 4 heures 30. — Cobaye 173 : 840 grammes. Reçoit trois gouttes de la même culture dans le cerveau. Après 10 minutes, hoquets, éternuements, agitation ; paralysie progressive du train postérieur ; contractions cloniques des muscles, chorée du diaphragme ; tombe sur le dos ; respiration accélérée. Température initiale 38°,5 ; après 3/4 d'heure 35°,5. Mort en 5 heures.

Cobaye 174 ; 800 grammes. Reçoit trois gouttes de la même culture, filtrée sur filtre Chamberland. Aucun accident immédiat. Etat comateux progressif ; température normale après une heure. Mort dans le coma en 18 heures.

Cobaye 175 : 800 grammes. Reçoit 3 gouttes de bouillon Martin dans le cerveau. Aucun accident.

L'étude comparée d'une série de cultures toxiques dans un même bouillon, à différents âges, filtrées et non filtrées, montre que la filtration altère surtout les propriétés des cultures jeunes. On peut admettre que la toxine reste adhérente aux corps microbiens pendant la pullulation bactérienne; sa diffusion s'opérerait partiellement par la dissolution des bactéries lors de la sporulation; or, celle-ci est complète vers le cinquième jour et c'est à ce moment que les filtrats possèdent leur toxicité maxima.

Comme pour les cultures entières, on constatera des différences marquées dans l'activité des filtrats suivant la qualité du bouillon ou les propriétés du microbe ensemencé. Nous obtenons des filtrats tuant le cobaye, dans le péritoine, à la dose de 5 c. c., tandis que les lapins succombent en quelques instants à une inoculation intra-veineuse de 3 c. c.

Exp. — Cobaye 54 ; 515 grammes, température 37°,5. Reçoit dans le péritoine 6 c. c. d'une culture filtrée âgée de 5 jours. Etat comateux progressif; poil hérissé; diarrhée. Température après une heure, 35°,3. Mort en 10 heures. — Cobaye 112 ; 320 grammes, température 38°,2. Reçoit dans le péritoine 5 c. c. d'une culture filtrée âgée de 5 jours. Mêmes symptômes que ci-dessus. Température après 2 heures, 30°,4; après 5 heures, 29°,8; après 6 heures, 26°. Mort en 7 heures. — Cobaye 129 ; 530 grammes; température 39°,5. Reçoit dans le péritoine 10 c. c. d'une culture filtrée âgée de 5 jours. Douleurs abdominales; puis coma. Température après 2 heures, 33°,4; après 5 heures 33°,2; après 7 heures 33°,5. Mort en 12 heures.

Lapin; 1,750 grammes. Reçoit dans la veine de l'oreille 3 c. c. 1/2 d'une culture filtrée âgée de 5 jours. Convulsions, paraplégie, spasme laryngien. Mort en 5 minutes.

Les cobayes qui reçoivent de faibles doses ou des filtrats moins toxiques ne présentent que des accidents atténués : somnolence, poil hérissé, diarrhée, hypothermie passagère de 2 à 3°. Ils succombent dans un état d'émaciation et de cachexie extrêmes, après un délai ordinaire de 7 à 9 jours; sur un total de 31 cobayes inoculés, deux seulement ont présenté une survie de 14 et de 23 jours.

Le tableau suivant indique les diverses variétés de l'intoxication; les pertes de poids constatées sont des plus remarquables.

	Culture filtrée âgée de	Quantité inoculée	Survie de	Poids Initial	Poids après 48 heures	Poids à la mort	Perte de poids
Cobaye 161	3 jours	5 c.c.	8 jours	370	305	215	155 gr.
— 163	3 —	5 —	8 —	310	260	185	125 —
— 169	8 —	6 —	7 —	340	270	190	150 —
— 170	8 —	5 —	23 —	300	240	200	100 —
— 180	5 —	5 —	14 —	415	»	170	245 —

L'action de la toxine est encore mieux démontrée par l'inoculation de cultures virulentes, chez des sujets rendus réfractaires au virus par le sérum de cheval immunisé. Tous les cobayes inoculés succombent en 15-30 jours en moyenne, considérablement amaigris. Le sérum, puissamment antivirulent, ne préserve pas contre la toxine; les traités meurent dans les mêmes conditions que les sujets qui reçoivent une faible quantité de toxine pure.

La toxine est altérée au contact de l'air ; une culture soumise à une large aération pendant 48 heures perd ses propriétés toxiques.

Par contre la toxine est très résistante à l'action de la chaleur; comme E. Roux l'a montré, elle n'est pas encore détruite après chauffage à 115° ; le chauffage à 70-75° pendant deux heures modifie seulement ses propriétés chimiotaxiques : de négatives qu'elles étaient, elles deviennent positives ; il est facile de s'en assurer en introduisant sous la peau ou dans le péritoine de lapins ou de cobayes, de petits tubes capillaires ouverts à une extrémité et contenant les uns du filtrat frais, les autres le même filtrat préalablement chauffé.

L'expérience suivante prouve que la toxine est encore capable de tuer après un chauffage à 115° pendant dix minutes, mais que ses propriétés sont fortement atténuées.

Exp. — Cobaye 142; 250 gr. Reçoit 5 c. c. dans le péritoine du filtrat d'une culture âgée de 5 jours. Température initiale, 38°,3 ; après 4 heures, 30°, 1. Mort en 10 heures environ.

Cobaye 143; 250 gr. Reçoit 8 c. c. dans le péritoine du même filtrat *chauffé*. Température initiale, 38°,3; après 4 heures, 32°,9 ; paraît rétabli le lendemain. Meurt cachectique en 8 jours.

Les effets physiologiques de la toxine sont tout différents suivant la dose inoculée et le mode de la pénétration.

L'intoxication rapide semble être la conséquence d'une fixation instantanée du poison sur certains éléments et notamment sur les centres nerveux. L'analyse des accidents observés lors d'inoculation directe dans le cerveau indique un envahissement progressif des hémisphères et de la moelle allongée.

Le cobaye et le lapin, inoculés dans les parties antérieures du cerveau, présentent toujours de la polyurie et de la glycosurie.

Dans l'intoxication aiguë, les accidents dominants sont le coma et l'hypothermie; ils reproduisent les phénomènes généraux de la maladie naturelle chez les bovidés, lors d'évolution rapide.

Lors d'intoxication lente, on note seulement de l'amaigrissement, de l'émaciation et un état de cachexie progressive avec terminaison constante par la mort.

RÉSISTANCE DU VIRUS

Il existe des dissidences quant à l'appréciation du degré de résistance du *virus frais* [1] à l'action de la chaleur.

Arloing et Cornevin enferment du virus frais dans de petits tubes scellés à la lampe qu'ils portent à l'étuve à des températures variables entre 60 et 80° ; ils constatent que le virus ne tue plus le cobaye après chauffage à 70° pendant deux heures vingt minutes ou à 80° pendant deux heures; chauffé seulement à 65°, pendant une heure dix minutes, il tue encore le cobaye en quarante-cinq heures.

Kitasato prétend que le jus, recueilli frais et desséché aussitôt, perd toute action après un chauffage de vingt minutes à 65°. D'après lui, la sporulation ne s'opère pas dans les tissus vivants; on ne rencontre dans ceux-ci que des bacilles réguliers ou des formes renflées contenant des corpuscules réfringents, facilement colorables par les procédés ordinaires. Ces renflements ne constituent pas des spores vraies ; celles-ci se forment seulement dans les cadavres ou dans les produits organiques recueillis. Ainsi, la sérosité virulente desséchée, 48 heures après

1. Avec MM. Arloing et Cornevin, nous désignons sous l'expression de *virus frais* le suc obtenu par la trituration et la compression des tissus compris dans la tumeur symptomatique.

la mort. et la viande conservée en gros morceaux résistent à l'action du chauffage dans les mêmes conditions [1].

On ne saurait, pour juger la conservation de la vitalité, se contenter de l'épreuve par l'inoculation au cobaye. On peut admettre que le chauffage altère ou détruit la virulence sans modifier cependant la vitalité du virus — et l'on verra plus loin que cette hypothèse est fondée Il faut de toute nécessité recourir à l'ensemencement.

Chez un grand nombre de cobayes, on recueille, aussitôt après la mort, le jus des tumeurs musculaires et la sérosité épanchée dans le tissu conjonctif des parties voisines. Avec ce produit, on remplit de petites ampoules qui sont scellées, puis chauffées au bain-marie, à 65°, pendant une demi-heure. Les liquides chauffés sont ensuite en partie inoculés et en partie ensemencés en bouillon Martin.

Les résultats obtenus par cette méthode sont variables : alors que les jus de muscles ont toujours conservé leur vitalité et leur virulence, qu'ils poussent en culture et qu'ils tuent les cobayes inoculés, les sérosités cultivent et tuent en certains cas, tandis qu'elles restent stériles et inoffensives en d'autres.

L'analyse bactériologique fournit une explication de ces faits. Alors que le jus de muscle renferme toujours des bactéries pourvues de spores réfringentes, les sérosités en sont ordinairement dépourvues. On n'y rencontre que des bacilles réguliers, ou encore des formes renflées en fuseau, fixant avec intensité le colorant ; la résistance de ces formes, qui correspondent sans doute aux premières phases de la sporulation, paraît être très variable. Chez un même sujet, on constatera ainsi la résistance au chauffage du jus de muscle, alors que la sérosité sera stérilisée.

Ces résultats permettent d'interpréter les constatations faites par Kitasato. Suivant le procédé de récolte employé et suivant la rapidité de l'évolution et de la sporulation dans les tissus, les effets du chauffage se montrent dissemblables.

Arloing et Cornevin ont observé que le virus desséché est plus résistant que le virus frais à l'action de la chaleur. Ils ont établi aussi que la chaleur sèche (air chaud) et la chaleur

1. Voir à ce sujet la critique du premier mémoire de Kitasato par M. Metchnikoff, *in Annales*, t. III, 1889, p. 331.

humide (vapeur d'eau) agissent différemment pour une même température. Nous avons constaté également que le jus de muscle desséché, préparé suivant le procédé d'Arloing, résiste à un chauffage dans l'air sec à 104° pendant 7 heures. Le même produit chauffé à l'autoclave, à la même température, pendant dix minutes, a complètement perdu sa virulence et sa vitalité.

Dans les bouillons, la résistance des spores est variable suivant l'âge des cultures. Les cultures âgées de 24 heures restent vivantes après un chauffage à 58-60° pendant un quart d'heure; elles sont tuées en une demi-heure à 70°. Après 48 heures, la culture résiste au chauffage à 70° pendant une demi-heure. Après quatre jours, la résistance a atteint son maximum, le chauffage à 80° pendant 2 heures laisse intacte la vitalité de la spore. A une température de 100°, la spore est détruite en quelques minutes; elle résiste à 90-95 pendant une demi-heure.

Ces données s'appliquent au développement régulier habituel des cultures en bouillon Martin. Toutes les circonstances qui retardent la sporulation modifient la résistance de la bactérie au chauffage; ainsi une culture âgée de 48 heures, renfermant des spores incomplètement formées, a été stérilisée en une demi-heure à 70°.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTIOLOGIE

Les belles recherches de Vaillard et de ses élèves sur l'infection tétanique ont élucidé le difficile problème de l'étiogénie en précisant les conditions nécessaires à la germination de la spore. On sait que Besson a appliqué les mêmes méthodes et constaté les mêmes faits en ce qui concerne le vibrion septique.

Ne retrouverait-on pas dans le charbon symptomatique les mêmes circonstances étiologiques? Il s'agit ici encore d'une infection provenant directement des sols, ne se produisant que sous certaines conditions de réceptivité et causée par un microbe à spores. Les analogies existant entre cette affection et la septicémie gangréneuse tendent encore à appuyer cette hypo-

thèse. Enfin certains des résultats expérimentaux déjà publiés sont étranges, contradictoires et les interprétations tentées sont manifestement insuffisantes.

LES SPORES SANS TOXINE NE TUENT PAS

Les données précédentes montrent que la spore adulte résiste pendant plusieurs heures à des températures comprises entre 80 et 85°, que la toxine est modifiée par le chauffage à 75°, au point de perdre ses propriétés chimiotaxiques négatives. Il devient ainsi possible de débarrasser la spore de la toxine adhérente.

Des cultures en bouillon Martin, âgées de 5 jours au moins, sont chauffées en ampoules pleines, scellées, au bain-marie, à des températures comprises entre 75 et 85°, pendant des temps variables.

Les cultures chauffées à 75° pendant 2 heures sont irrégulières dans leurs effets; elles tuent parfois les animaux sans retard appréciable dans l'évolution. Après 2 heures de chauffage à 78°, ou une heure à 80-85°, les inoculations restent très généralement sans effet. Enfin, les cultures chauffées à 85° pendant 2 heures, ou à 80° pendant 3 heures, ne tuent en aucun cas les cobayes inoculés.

On peut inoculer impunément des quantités considérables de spores chauffées. Pour obtenir les spores en très grand nombre, nous recommandons la technique suivante : les cultures sporulées donnent après 3 jours un dépôt abondant ; on décante alors le liquide épuisé par la culture et on le remplace par du bouillon neuf ; une pullulation nouvelle s'opère, suivie d'un nouveau dépôt ; si l'on renouvelle à deux reprises la même opération, on voit au fond des tubes un épais dépôt constitué par des millions de spores accumulées. On agite alors les tubes, et leur contenu réparti en ampoules est chauffé à 80° pendant 2-3 heures. Des numérations, par ensemencement de dilutions successives en gélatine et gélose, montrent qu'on peut évaluer approximativement à 5 millions le nombre des spores contenues dans un centimètre cube du dernier bouillon utilisé.

Les inoculations intra-musculaires de 1/2 à 1 c. c. de cette culture chauffée ne provoquent aucun accident.

Quarante cobayes pesant de 170 à 700 grammes ont résisté à l'inoculation.

Exp. — Cobaye 35 ; 400 grammes ; 1/2 c. c. culture chauffée 2 heures à 80° (environ 3,000,000 de spores) ; œdème local à peine sensible. Survit.

Cobaye 116; 270 grammes; 1 c. c. culture chauffée 3 heures à 80°, aucun accident (5,000,000 de spores).

Cobaye 122; 400 grammes ; 1 c. c. culture chauffée 2 heures à 80° (5,000,000 de spores), un peu d'œdème local. Survit.

On peut se demander jusqu'à quel point les masses de spores injectées sont tolérées par l'organisme. Le cobaye peut supporter jusqu'à 4 c. c. de bouillon chauffé, soit 20 millions de spores.

Exp. — Cob. 165; 330 grammes. Reçoit 3 c. c. d'une culture chauffée 3 heures à 80°. Aucun accident local. Survit.

Cob. 166; 270 grammes; 4 c. c. de la même culture, soit environ 20 millions de spores, pas d'accident local grave. Survit.

Cob. 167; 400 grammes; 3 c. c. même culture. Survit.

Toutefois, l'innocuité de doses aussi considérables n'est plus certaine. Dans l'expérience ci-dessus, un cobaye qui reçoit 3 c.c. de la culture chauffée meurt en 18 heures, avec des lésions caractéristiques.

L'inoculation des spores pures dans le péritoine se montre également inoffensive. Le cobaye reçoit ainsi jusqu'à 3 c.c. sans éprouver aucun trouble.

Les spores provenant de cultures chauffées ont conservé toute leur vitalité ; *ensemencées, elles donnent des cultures très virulentes :* cependant elles ne germent pas dans les tissus. L'innocuité de la spore pure ne tient point à une atténuation de sa virulence, car les cobayes qui en ont reçu de grandes quantités ne possèdent dans la suite aucune immunité.

Si, 12 à 15 heures après la pénétration des spores, on recueille, dans le petit foyer inflammatoire développé au niveau du point d'inoculation, une trace de l'exsudat, on y rencontre de très nombreux leucocytes accumulés. Après coloration par la fuchsine de Ziehl, décoloration à l'alcool et recoloration au bleu de méthylène, on voit que toutes les spores ont été ingérées par les leucocytes. Certains phagocytes littéralement bourrés renferment jusqu'à 12 ou 15 spores. Les rares spores non incluses

ont été libérées par l'écrasement de quelques leucocytes lors de la fixation : aucune n'a donné de mycélium. Après 48 heures il n'existe plus localement qu'une petite nodosité légèrement densifiée ; les leucocytes rencontrés à ce niveau sont granuleux, vacuolaires ; on n'y distingue plus de spores colorables. Le noyau induré du point d'inoculation disparaît du quinzième au vingtième jour.

Lors d'inoculation intra-péritonéale, les spores pures sont très rapidement englobées par les leucocytes ; il est facile de suivre les phases de la phagocytose par des prélèvements répétés d'une petite quantité d'exsudat péritonéal.

LES SPORES GERMENT LORSQU'ELLES SONT PROTÉGÉES CONTRE LES PHAGOCYTES

Ainsi la phagocytose triomphe rapidement de la spore dépourvue de toxine. Si la protection contre les phagocytes est véritablement liée à la présence de la toxine, on doit rendre sa virulence à la spore en lui restituant la toxine. D'autre part si l'infection n'est possible qu'en l'absence de la phagocytose, la spore dépourvue de toxine, mais protégée contre les phagocytes, doit germer, donner de la toxine et provoquer l'évolution virulente.

a) Restitution de la toxine à la spore. — La spore chauffée est impuissante, bien que vivante et non atténuée. Si, à une dose certainement inoffensive de spores pures, on ajoute une certaine quantité de toxine, les spores germent dans les tissus et provoquent une infection typique.

Exp. — Cob. 72 ; poids 500 grammes ; reçoit 1/2 c. c. d'une culture chauffée pendant 2 heures à 80°, additionnée d'un c. c. de toxine, dans les muscles de la cuisse. Meurt en 48 heures, avec tuméfaction considérable.

Cobaye 123 ; poids 400 grammes ; reçoit 1 c. c. spores pures, additionné de 3 c. c. de toxine, dans les muscles de la cuisse. Tuméfaction énorme après 15 heures. Mort en trente heures.

Cobaye 124 ; poids 600 grammes. Reçoit 1 c. c. spores pures, additionné de 3 c. c. toxine, dans les muscles de la cuisse. Tuméfaction très étendue après 12 heures, mort en 30 heures.

Cobaye 137 ; 630 grammes. Reçoit dans les muscles de la cuisse 1/2 c. c. spores pures, additionné de 2 c. c. toxine ; mort en 40 heures.

Dans tous les cas, les témoins inoculés avec des doses égales

ou supérieures de spores pures restent complètement indemnes.

Une dose assez forte de culture filtrée est nécessaire pour assurer l'infection. Il ne suffit pas de restituer aux spores débarrassées de toxine une quantité de filtrat égale en volume à la quantité de culture virulente strictement suffisante pour tuer. C'est qu'en effet le filtre retient une forte proportion du poison. La dose minima nécessaire, évidemment variable suivant la richesse en toxine du bouillon filtré, correspond en moyenne à 1 c. c.

b) Addition d'acide lactique. — La restitution de la toxine a eu pour effet de modifier complètement les conditions de la phagocytose. Protégées contre les phagocytes par les propriétés chimiotaxiques négatives de la toxine, les spores germent sur place et l'infection s'opère. Si cette interprétation est exacte, toutes les influences capables d'enrayer la phagocytose devront permettre à la spore de manifester sa virulence.

On sait que l'acide lactique favorise puissamment l'infection par le *Bacterium Chauvœi*. Un virus atténué, additionné d'acide lactique, tue comme un virus fort ; dans les mêmes conditions un virus normal tue les animaux réfractaires comme le lapin. Arloing et Cornevin croient à une exaltation de la virulence ; Nocard et Roux montrent qu'en réalité le virus n'est point exalté, mais que les tissus modifiés deviennent incapables d'entraver la germination des spores. « Toute action qui diminuera la vitalité des tissus... facilitera le développement des germes en affaiblissant la concurrence des cellules et paraîtra ainsi leur restituer la virulence. » En dehors de l'acide lactique, l'acide acétique, le lactase de potasse... le simple traumatisme exercent la même action. Vaillard et Vincent constatent que l'acide lactique exerce une action répulsive sur les leucocytes ; Massart et Bordet démontrent complètement ses propriétés chimiotaxiques négatives.

Pour la bactérie du charbon symptomatique comme pour le bacille du tétanos, l'acide lactique agit en empêchant la phagocytose ; il suffit d'additionner la spore pure d'une faible quantité d'acide lactique pour provoquer un magnifique charbon expérimental. Des spores données impunément par millions tuent à des doses dix fois plus faibles si on y ajoute une goutte d'acide lactique.

Exp. — Cobaye 94; poids 240 gr. Reçoit dans les muscles de la cuisse 1 c. c. spores pures; ne présente qu'une réaction locale bénigne. Survit.

Cob. 95; 240 gr. Reçoit dans les muscles de la cuisse 1/8 de c. c. des spores inoculées au cobaye 94, additionnées d'une trace d'acide lactique; meurt en 18 heures.

Cob. 122; 400 gr. Reçoit dans les muscles de la cuisse 1 c. c. spores pures. Survit.

Cob. 126; 690 gr. Reçoit dans les muscles de la cuisse 1/4 c. c. spores pures et une trace d'acide lactique. Meurt en 24 heures.

Cob. 166; 270 gr. Reçoit dans les muscles de la cuisse 4 c. c. spores pures. Survit.

Cob. 168; 470 gr. Reçoit dans la cuisse 1/8 c. c. spores inoculées au cobaye 166 et une trace d'acide lactique. Meurt en 26 heures.

Nous avons montré déjà que les propriétés des spores n'étaient nullement modifiées par le chauffage. Les expériences comparatives montrent qu'après l'addition d'acide lactique la spore pure tue aussi vite que la culture fraîche dont elle est issue.

Exp. — Cob. 135; 720 gr. Reçoit dans les muscles de la cuisse 1/2 c. c. culture fraîche, 24 heures.

Cob. 136; minutes 690 gr. Reçoit dans les muscles de la cuisse 1 c. c. même culture, chauffée 25, à 80°. Survit.

Cob. 141; 780 gr. Reçoit dans la cuisse 1/2 c. c. de spores pures, additionnées d'une trace d'acide lactique. Mort en 24 heures.

c) *Procédés mécaniques.* — D'autres méthodes d'ailleurs permettent d'enrayer la phagocytose. Il suffit d'associer la spore pure à des corps pulvérulents inertes pour lui assurer une protection suffisante, La culture chauffée est versée sur du sable stérile très fin. On évapore rapidement à 38° et on brise en petits fragments la masse granuleuse obtenue. Toutes ces manipulations doivent être faites aseptiquement.

Si l'on introduit purement ces conglomérats sableux sous la peau de cobayes, on voit presque toujours le charbon évoluer. Les spores réparties à la surface des amas sableux sont atteintes et ingérées par les phagocytes; mais celles qui sont incluses dans le centre de la masse, momentanément à l'abri des cellules. germent dès qu'elles sont imprégnées par les sucs organiques. On s'explique que l'infection soit d'autant plus certaine que les masses introduites, plus volumineuses et moins friables, ont assuré à la spore une protection plus complète et plus durable.

Exp. — Cob. 87 ; 500 gr. Reçoit sous la peau 1/4 c. c. de culture chauffée à 80°, desséchée sur sable ; meurt du charbon en 4 jours.

Cob. 106 ; 480 gr. Reçoit sous la peau 1/2 c. c. culture chauffée desséchée sur sable ; meurt en 3 jours.

Si l'on a le soin, comme l'ont fait Vaillard et Rouget pour le tétanos, d'envelopper le sable dans un sac de papier, la protection contre les phagocytes est plus complète, toutes les spores introduites ont le temps de germer et l'évolution n'est que faiblement retardée.

Exp. — Cob. 86 ; 500 grammes. Spores sur sable 1/2 c. c. dans un sac introduit sous la peau de l'abdomen. Mort en 40 heures.

Cob. 91 ; 530 grammes. Reçoit sous la peau un sac contenant 1/2 c. c., spores pures sur sable. Meurt du charbon en 38 heures.

Cob. 107 ; 508 grammes. Reçoit sous la peau un sac contenant 1/2 c. c. de spores pures sur sable. Mort en 34 heures.

On trouve à l'autopsie des lésions considérables ; les gaz développés ont décollé la peau sur une large étendue. Dans l'eau de lavage du sable enfermé dans le sac, on rencontre des bactéries courtes encore asporulées et de très rares leucocytes. L'ensemencement donne une culture pure virulente.

Ces dernières expériences montrent qu'il suffit de protéger *mécaniquement* la spore pour voir l'infection se produire ; l'on ne saurait alléguer ici une modification de la virulence, comme lorsqu'on associe au virus une substance chimique, et le rôle exclusif de la phagocytose dans la protection apparaît en pleine évidence.

d) *Associations microbiennes.* — Les intéressantes recherches de M. Roger [1] autorisent à supposer que les associations microbiennes jouent un rôle important dans la pathogénie des lésions charbonneuses. Des formes bactériennes diverses sont signalées dans les tumeurs symptomatiques ; certains résultats expérimentaux montrent que les associations exercent une action tantôt favorisante, tantôt empêchante.

Sans doute les microbes associés ne sauraient jouer un rôle comparable à celui qu'ils remplissent dans les infections tétanique ou septique, qui succèdent presque toujours à un traumatisme. Cependant les incertitudes mêmes de la pathogénie dans l'évolution naturelle du charbon symptomatique autorisent toutes les hypothèses.

1. Roger. *Comptes rendus de la Soc. de biologie*, 1889, p. 77, 242, 476 et 550.

Il est vraisemblable que la spore provenant des sols n'arrive point chargée de toxine au contact des organismes, qu'elle germe dans les cavités digestives et qu'elle pénètre à l'état de mycélium dans les milieux lymphatiques. D'autre part, la présence de la spore dans l'intestin ne suffit point pour assurer l'infection : si les lésions locales de la muqueuse ou une brèche dans les revêtements endothéliaux des vaisseaux suffisent théoriquement pour expliquer l'apparition des accidents, on peut admettre aussi que des microbes étrangers favorisent l'implantation et la pullulation du *Bacterium Chauvæi*, en paralysant la défense phagocytaire.

Nous avons fréquemment inoculé des spores pures associées à divers microbes, non pathogènes pour le cobaye. L'association au bacille du rouget, à diverses variétés de *b. coli*, s'est montrée sans effet ; l'adjonction d'un streptothrix [1], d'un streptocoque non pathogènes et du staphylocoque blanc, provoque soit des accidents locaux graves, soit la mort avec des lésions charbonneuses typiques.

Exp. Une série de cobayes reçoivent un mélange de culture chauffée à 80° et de cultures de différents microbes.

	CULTURE CHAUFFÉE	MICROBES ASSOCIÉS	RÉSULTAT
Cobaye 85 350 gr.	1/2 c. c.	1 c. c. culture rouget	Œdème local douloureux. — *Survie.*
Cobaye 99 230 gr.	1/4 c. c.	1/2 c. c. staphylocoque blanc.	Œdème énorme. — *Mort* du charbon en 43 heures.
Cobaye 125 600 gr.	1 c. c.	1/2 c. c. streptocoque	Œdème local. — *Survie.*
Cobaye 140 490 gr.	1/2 c. c.	1 c. c. coli.	Tuméfaction locale qui persiste pendant 15 jours. — *Survie.*
Cobaye 178 565 gr.	1 c. c.	1/2 c. c. streptothrix	Lésions locales étendues. — *Mort* du charbon en 4 jours.

1. Il s'agit d'une forme chromogène non décrite, dont l'étude sera prochainement publiée.

On peut voir que des formes habituellement pathogènes, comme le streptocoque et le *b. coli*, n'entraînent point l'infection, tandis qu'un microbe totalement inoffensif comme le streptothrix employé assure l'évolution dans la plupart des cas[1].

Parmi les animaux qui survivent, ceux-là seulement qui ont présenté des accidents locaux sont immunisés. Inoculés après 8-15 jours avec un virus d'activité moyenne, mais suffisant pour tuer sûrement les témoins, ils résistent à l'épreuve. Ceux-là au contraire qui n'ont rien montré localement ne possèdent aucune immunité; ils se comportent comme ceux qui ont reçu les spores pures.

En résumé :

1° La bactérie du charbon symptomatique donne dans les cultures, dans les conditions indiquées, une toxine active, capable de provoquer à elle seule des accidents graves et la mort ;

2° Les spores pures, débarrassées de toxine, introduites dans les tissus, même à des doses considérables, sont incapables de germer et de provoquer l'infection ;

3° La résistance de l'organisme est liée à l'action phagocytaire. Toutes les causes capables d'entraver ou d'empêcher la phagocytose favorisent ou assurent l'infection.

1. Il nous a paru intéressant de rechercher si certains d'entre les microbes habituels de l'intestin des bovidés ne posséderaient pas une influence favorisante spéciale. Chez six bovidés sacrifiés pour la boucherie, âgés de 5 à 8 ans, on recueille le produit de raclage de la muqueuse intestinale, après évacuation du contenu de l'intestin. L'ensemencement en bouillon donne une flore variée ; on trouve du coli, des cocci de dimensions diverses, plusieurs streptocoques, du *bacterium termo* et un très fin bacille prenant le Gram. Les cultures mixtes sont inoculées à une série de cobayes, associées à des spores pures. Aucun des animaux éprouvés ne succombe ; les accidents locaux sont insignifiants.

LA MALADIE DES CYGNES COSCOROBA

Par E. TRÉTROP.

Directeur de l'Institut bactériologique d'Anvers.

Marche de l'épidémie. — La maladie a été observée en janvier 1900 au Jardin zoologique d'Anvers, sur une seule espèce de cygnes: les cygnes coscoroba (*coscoroba candida*). Sur 50 cygnes, la moitié a succombé.

Les sujets atteints avaient été récemment importés d'Amérique. Le *Coscoroba candida*, originaire de l'Amérique antarctique, ne se reproduit que très rarement dans nos contrées.

A la suite des mesures d'isolement et de désinfection, l'épidémie semble aujourd'hui éteinte.

Quant à l'origine du mal, elle nous est inconnue. Aucune des espèces qui ont été en contact dans le même étang avec les cygnes coscoroba n'était malade et toutes sont restées ultérieurement bien portantes. Les coscoroba ont-ils été importés avec les germes de la maladie, ou, affaiblis par le transport, ont-ils fourni un terrain favorable à l'évolution d'un germe local? C'est ce que nous n'avons pu encore élucider.

*
* *

Étude clinique. — Les cygnes malades restent en place; s'ils trouvent un coin, ils vont s'y blottir. Vient-on à les tirer de leur somnolence, ils se mettent en marche en manifestant une très méchante humeur. La démarche est lourde, mal assurée. Le plumage n'offre rien de spécial. A l'état normal, le *coscoroba candida* va peu à l'eau, il se tient de préférence sur la berge. Atteint du mal, il reste continuellement à terre. Certains sujets semblent devenus aveugles.

L'appétit est nul. L'animal ne mange plus, mais il continue à boire. Il a de la diarrhée. Les excréments sont jaunâtres ou

jaune verdâtre, avec de petits grumeaux blanchâtres rappelant les selles lientériques des nourrissons.

L'affection évolue à l'état aigu en 4 ou 5 jours, mais elle peut avoir une durée beaucoup plus considérable. La mort arrive sans convulsions, sans secousses. Le plus souvent on trouve le matin la bête étendue dans sa cage.

La maladie est contagieuse. Elle se transmet de coscoroba à coscoroba, mais elle respecte les autres espèces de cygnes, les oies, les sarcelles et les canards.

Voici la liste des nombreuses espèces qui ont été en contact avec les coscoroba malades et qui sont restées indemnes. Le renseignement m'a été fourni avec la plus aimable obligeance par M. L'Hoëst, directeur du Jardin zoologique d'Anvers.

Cygnes noirs d'Australie (*Cygnus atratus*) ;
Cygnes blancs à cou noir d'Amérique (*Cygnus nigricollis*) ;
— sauvages (*Cygnus musicus*) ;
Oies armées du Sénégal (*Plectropterus gambensis*) ;
Canards musqués (*Cairina moschata*) ;
— carolins (*Aex sponsa*) ;
— mandarins (*Aex galericulata*) ;
Oies céréopses d'Australie (*Cereopsis novae Hollandiae*) ;
— des neiges (*Chen hyperboreus*) ;
— bavrées de l'Inde (*Anser indicus*) ;
— cygnoïdes (*Anser cygnoïdes*) ;
Bernâches de Magellan (*Bernicha Magellanica*) ;
Canards dendrocygnes ou percheurs fauves (*Dendrocygna fulva*) ;
— — arcuata (*Dendrocygna arcuata*) ;
— à masque blanc (*Dendrocygna vidicata*) ;
Oies d'Egypte (*Chenalopex ægyptianus*) ;
Canards tadomes (*Tadorna cornuta*) ;
— cararkas (*Tadorna cararca*) ;
— chipeaux (*Chaulelasmus streperus*) ;
— siffleurs (*Marera penelope*) ;
— pilets (*Dafila acuta*) ;
— spinicandes (*Dafila spinicanda*) ;
— souchets (*Spatula clypeata*) ;
— peposaca (*Metoprana peposaca*) ;
— milouins (*Fuligula ferina*) ;
— morillons (*Fuligula cristata*) ;
Sarcelles d'été et d'hiver.

Tous ces palmipèdes étaient lâchés dans le même étang et prenaient la nourriture en commun.

Étude anatomo-pathologique. — Les sujets sont encore généralement bien en chair. La graisse a disparu. Les muscles n'offrent rien de spécial. Le cœur paraît normal.

On rencontre ordinairement de la congestion active dans les deux poumons ; parfois un ou deux foyers caséeux à la base, au sein du parenchyme. Ces foyers, de la grosseur d'un grain de blé, s'énucléent facilement.

Le foie est augmenté de volume, noir ; il offre fréquemment de petits tubercules blanchâtres, comme de petites têtes d'épingles. On y trouve aussi ordinairement de nombreux foyers caséeux blanc jaunâtre, de la grosseur d'un grain de millet.

La rate est parfois peu engorgée, parfois légèrement augmentée de volume, diffluente, noire.

L'intestin est toujours diarrhéique, à contenu jaunâtre ou jaune verdâtre, les anses intestinales sont ballonnées, mais on ne constate pas d'injection bien marquée du système vasculaire.

On rencontre fréquemment dans la cavité abdominale des ganglions d'aspect caséeux qui peuvent atteindre le volume d'une petite noisette, notamment au voisinage de la colonne vertébrale.

Dans un cas, une masse de graisse épiploïque formait un bloc compact de l'estomac et des anses intestinales.

En détachant l'estomac, on apercevait à sa face postérieure 10 ou 12 petits tubercules blanc grisâtre de la grosseur d'un pois. L'énucléation se faisait avec la plus grande facilité. La plupart de ces tubercules étaient arrondis. Ils étaient logés dans l'épaisseur du péritoine viscéral. Le feuillet péritonéal de la rate en portait également 3 ou 4. La paroi de l'estomac ne présentait pas de tubercule, pas plus que la rate.

Parfois les tubercules du péritoine sont ombiliqués.

Les lésions constantes de la maladie des cygnes coscoroba sont celles de l'intestin. Dans les cas suraigus, ce sont les seules que l'on rencontre accompagnées de congestion pulmonaire.

* *

Bactériologie. — On trouve constamment, dans les organes des

animaux atteints, une bactérie qui reproduit la maladie chez certains animaux de laboratoire.

Cette bactérie, que nous appellerons *bacillus coscoroba*, est ovoïde et mesure 1 μ 5 à 2 μ 8 de longueur sur 1 μ à 1 μ 4 d'épaisseur. Elle se colore lentement par le ziehl dilué, mieux par la thionine phéniquée après quelques minutes de contact, instantanément par le krystal violet phéniqué. Ce dernier colorant gonfle les bactéries et masque les détails. La thionine phéniquée fournit les plus belles préparations.

Les coccobacilles des organes retiennent fortement la matière colorante aux pôles, le centre restant clair.

Les formes en *lunettes* constituées par l'accolement de deux coccobacilles à pôles colorés y sont fréquentes. La bactérie rappelle beaucoup dans la rate l'aspect du bacille pesteux. Dans cet organe et dans le contenu intestinal, elle présente ses plus grandes dimensions. Elle ne prend pas le Gram.

Les cultures s'obtiennent aisément du contenu intestinal qui la renferme toujours en abondance, seule ou associée à de rares espèces étrangères. On la trouve, mais non d'une façon constante, à l'état de pureté dans la rate ainsi que dans les masses caséeuses. Assez fréquemment les frottis de rate sont stériles. Le sang du cœur a été trouvé régulièrement stérile.

Le bacille coscoroba pousse également bien sur bouillon, lait, gélose, gélatine, moins bien sur eau peptonisée, et pour ainsi dire pas sur pomme de terre.

Il est à la fois aérobie et anaérobie. Toutefois la culture en présence d'oxygène est plus abondante.

Sur gélose, les colonies isolées sont assez régulièrement arrondies, blanchâtres, opaques, bombées; elles peuvent atteindre, en 14 ou 15 heures à 37°, 3 millimètres de diamètre et jusque 5 millimètres en 48 heures.

En strie, il se développe, après 24 heures d'incubation à 37°, une bande blanche luisante surélevée, à bord légèrement sinueux, le centre est opaque, les bords sont transparents. Par réflexion, la culture offre des reflets irisés.

Les jours suivants, la couche s'épaissit en conservant les mêmes caractères, après trois semaines la culture atteint 4 ou 5 millimètres en largeur, elle est épaisse, dentelée sur les bords.

Le bouillon se trouble dans les 24 heures ; il offre à la surface, contre la paroi du tube, un anneau blanchâtre, il y a un léger dépôt blanc au fond du tube. Les jours suivants, le trouble devient plus intense, l'anneau de la surface donne des grumeaux par agitation, le dépôt du fond augmente.

Après un mois ces caractères persistent.

Le lait après 24 heures devient épais, crémeux, parfois il est déjà coagulé en masse avec expulsion du sérum. La coagulation est complète après 48 heures.

Sur eau peptonisée, on observe après 24 heures une opalescence uniforme ; après 48 heures celle-ci s'accentue, il y a un léger anneau blanchâtre à la surface et un peu de dépôt de même couleur au fond du tube. Le réactif de Salkowsky y décèle la présence d'indol.

Sur pomme de terre, on observe après 24 heures une légère couche visqueuse transparente, luisante, qui reste stationnaire et même s'efface en vieillissant ; la culture y est très pénible.

Sur gélatine en piqûre à 20°, il se produit après 24 heures une ligne blanchâtre peu épaisse le long du trait d'ensemencement ; à la surface, la culture est bombée, blanchâtre, en tête de clou irrégulière. La gélatine n'est jamais liquéfiée.

Toutes ces cultures, surtout les cultures en bouillon, dégagent une odeur de poisson.

En culture anaérobie, le bacille se développe particulièrement bien en bouillon, le lait est coagulé dans les 24 heures.

Les cultures anaérobies n'ont pas d'odeur.

Celles qui proviennent des masses caséeuses se développent plus faiblement que celles du contenu intestinal ou de la rate. Sur gélose elles se développent plus lentement, sont moins opaques et moins étendues ; en bouillon, le trouble est moins intense.

Les bacilles des cultures en bouillon âgées de 24 heures se présentent sous forme de petits bâtonnets à bouts arrondis, de dimensions inégales, plus longs et plus grêles que ceux des organes. Ils se colorent plus fortement vers les extrémités. On observe des formes en sablier allongé. Sur gélose les formes sont plus courtes.

Le bacille coscoroba est animé de mouvements d'oscillation sur place. Son optimum de température est de 37° centigrades.

Il résiste à un chauffage à 58° pendant 5 minutes. Il n'est pas sûrement tué par un chauffage à 60° pendant le même laps de temps. il perd toute vitalité après dix minutes d'exposition à 60° ou deux minutes à 100°.

Action pathogène. — La souris est très sensible à l'inoculation du bacille coscoroba, elle meurt en moins de 24 heures lorsqu'on lui injecte dans le péritoine le contenu d'une minuscule anse de platine de jeune culture sur gélose. L'inoculation sous-cutanée de la même dose la tue dans les 48 heures.

Déjà une heure après l'inoculation péritonéale, l'animal a le poil hérissé, il ne tarde pas à se mettre en boule, il meurt recroquevillé sur lui-même, l'anus fréquemment souillé de matières diarrhéiques jaunâtres.

A l'autopsie, on trouve un exsudat séreux dans le péritoine; l'intestin est ballonné, à contenu diarrhéique jaunâtre; la rate est augmentée de volume, noire; les poumons présentent une légère congestion, parfois au contraire ils sont pâles.

Le sang du cœur montre à l'examen direct des bactéries ovoïdes, généralement peu nombreuses. Dans les frottis de la rate on les trouve en très grande abondance, ainsi que dans le contenu intestinal.

La culture du sang du cœur fournit à l'état de pureté le bacille spécifique; il en est de même du suc de la rate.

Par ingestion, la souris blanche ne prend pas la maladie. On peut lui faire ingérer impunément des fragments de rate ou des déjections de coscoroba malades.

Les passereaux succombent rapidement à l'inoculation dans le muscle pectoral d'une ou deux gouttes de culture jeune en bouillon. Contrairement aux souris, ils prennent la maladie par simple cohabitation. Ils se mettent en boule, deviennent somnolents, ont de la diarrhée, et meurent en 6 à 8 jours après l'apparition des premiers symptômes. La période d'incubation varie de 8 à 12 jours.

A l'autopsie de ceux qui ont été inoculés et de ceux qui ont contracté le mal par cohabitation, on retrouve le bacille dans le sang du cœur et surtout dans le contenu intestinal où il pullule.

Le canard et la poule sont réfractaires à la maladie.

On peut injecter à plusieurs reprises le contenu d'une grosse

anse de platine dans le muscle pectoral de la poule sans observer de symptômes généraux. Il n'y a qu'un léger empâtement local qui disparaît rapidement. L'injection au même endroit d'une légère émulsion de pulpe de rate de cygne coscoroba riche en bacilles est également négative.

Le canard résiste à l'inoculation dans le muscle pectoral. Il ne paraît pas incommodé.

Nous avons vu plus haut que de nombreuses espèces de cygnes, d'oies, de canards et de sarcelles ont pu cohabiter avec les cygnes coscoroba malades sans contracter la maladie, et cependant les déjections des coscoroba atteints fourmillent de bactéries spécifiques.

Le cobaye offre des lésions variables. L'inoculation intrapéritonéale de bacilles isolés de la rate des cygnes coscoroba détermine ordinairement un vaste empâtement tout autour de la piqûre. Cet empâtement est douloureux au toucher, il ne passe pas à suppuration; l'état général reste bon. Les jours suivants, la réaction locale s'atténue, et au bout de 15 jours à 3 semaines tout a disparu.

L'inoculation d'un bacille isolé des masses caséeuses a été plus sévère. La mort survient en 3 ou 4 jours.

A l'autopsie, on trouve un vaste empâtement de la paroi abdominale tout autour du point d'inoculation; il n'y a pas de pus. On constate une légère péritonite exsudative. L'intestin grêle est diarrhéique à contenu jaune brun clair. La rate est énorme, piquetée. Le foie est pâle, piqueté également. Du côté des poumons il y a de la pneunomie.

Dans un cas, j'ai trouvé du pus crémeux épais dans les deux plèvres. Ce pus renfermait des quantités énormes de bacilles coscoroba à l'état de pureté.

Le bacille coscoroba se retrouve chez le cobaye dans le sang du cœur et dans le suc de la rate.

Il est à noter que chez la souris, la bactérie isolée de la rate ou des masses caséeuses produit des lésions identiques : l'évolution est suraiguë.

Nous avons déjà constaté plus haut de légères différences dans la culture de la même bactérie isolée d'organes différents.

Atténuation du bacille. — Les cultures sur gélose âgée d'un

mois ont perdu de leur virulence; la moitié des souris environ résiste à l'inoculation sous-cutanée.

On peut arriver à les vacciner en leur injectant de très petites doses de cultures de moins en moins âgées. La souris inoculée avec un peu de culture chauffée 10 minutes à 58° n'est que légèrement incommodée. L'opération de la vaccination est délicate. Je n'ai pas eu l'occasion de vacciner des cygnes coscoroba; on arriverait sans doute avec quelques tâtonnements à les protéger contre la maladie[1].

Prophylaxie. — J'ai préconisé l'isolement des *Coscoroba candida* non seulement loin des autres palmipèdes, mais, vu la contagion pour les passereaux, loin des oiseaux de toute espèce. Les coscoroba malades ont été mis à part. J'ai conseillé la désinfection du sol et des abris contaminés à l'aide du lait de chaux ou de la solution de formol à 5 0/0. La maladie paraît enrayée.

Résumé et conclusions. — La maladie des cygnes coscoroba est contagieuse et inoculable; elle affecte principalement le tractus intestinal; on pourrait la dénommer le *choléra des cygnes coscoroba.* Elle reconnaît pour agent causal un coccobacille. Spéciale au coscoroba candida, elle peut se communiquer spontanément aux passereaux par simple cohabitation. Les déjections des animaux malades propagent la maladie.

Le diagnostic est aisé par l'examen direct des déjections et la culture.

Les mesures prophylactiques sont toutes-puissantes pour enrayer une épidémie.

L'étude de la maladie des cygnes coscoroba et de la bactérie qui la détermine, bactérie pathogène pour certaines espèces, inoffensive pour d'autres, telles que les poules et les canards, permet de différencier nettement cette affection du choléra des poules et autres oiseaux de basse-cour, de la dysenterie épizootique des poules et des dindes de Lucet, et du choléra des oiseaux aquatiques de Willach.

1. Le couple de coscoroba candida valait au moment de l'épidémie 150 francs, le prix s'élève parfois de 200 à 250 francs; les pertes sont donc sensibles.

Anvers, le 24 mars 1900.

ACTION DE LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE

SUR LES HYDRATES DE CARBONE

Par Mlle NAPIAS

La chimie des infiniment petits constitue aujourd'hui le chapitre le plus important de la chimie biologique, et les notions qu'elle fournit dominent et éclairent la physiologie tout entière.

La vie d'un être n'est, en effet, que la résultante des vies individuelles des cellules qui le constituent; pour comprendre le fonctionnement d'un mécanisme complexe, il faut savoir comment fonctionne chaque rouage isolé : avant d'aborder la physiologie de l'être, il faut connaître la physiologie de la cellule.

Les éléments anatomiques des tissus sont différenciés en vue du rôle qu'ils jouent dans l'être, et leurs aptitudes fonctionnelles sont restreintes; pour vivre, ils ne peuvent s'accommoder que de conditions extrêmement étroites, presque toujours impossibles à réaliser en dehors de l'organisme même auquel ils appartiennent. La vie de pareils éléments ne peut être isolée de la vie de l'ensemble; ils se prêtent donc mal aux nécessités de l'expérience.

Les microbes, au contraire, sont des cellules isolées, organisées pour vivre seules, peu délicates, et vivant très bien dans les milieux artificiels que nous savons leur composer; ils constituent donc un merveilleux instrument pour l'étude du chimisme cellulaire, instrument d'autant plus précieux que, d'un bout à l'autre de l'échelle des êtres, les phénomènes d'assimilation et de désassimilation sont le résultat d'actions physico-chimiques dont les lois sont indépendantes de l'appareil spécial, de la cellule particulière au sein desquels ils s'accomplissent : le globule de levure et la cellule de nos muscles vivent de la même manière.

Pour un grand nombre de microbes, l'intérêt scientifique de leur étude s'est tout de suite doublé d'un intérêt pratique : la physiologie mieux connue des ferments industriels a régénéré

l'industrie des fermentations ; celle des ferments de l'azote est à la veille de régénérer l'agriculture. C'est de ce côté que l'intérêt pratique a surtout fait naître les travaux, et la plupart des renseignements que nous possédons sur la chimie des infiniment petits ont été acquis à l'occasion de recherches entreprises en vue d'applications industrielles ou agricoles.

Dès le début des études bactériologiques, les microbes pathogènes ont très vivement sollicité l'attention des savants, mais celle-ci s'est concentrée sur l'observation des phases de la lutte qui s'établit entre eux et l'organisme envahi, et sur la recherche des moyens propres à venir immédiatement en aide à celui-ci.

La nécessité d'une étude des propriétés chimiques de ces microbes n'est donc pas apparue tout d'abord; mais, aujourd'hui, une évolution se produit : aux études chimiques, on va demander les caractères biologiques qui permettent de définir avec précision chaque ferment, et de différencier entre elles des races très voisines, comme le bacille typhique et le *bacterium coli*.

De nombreux travaux (1) ont montré l'influence qu'exerce, sur la production des toxines, la nature des substances présentes dans le liquide de culture, et sur lesquelles le microbe peut agir; ces notions ont une importance considérable, non seulement au point de vue pratique de la préparation des toxines *in vitro*, mais encore au point de vue de l'interprétation du mécanisme de leur production au sein de l'être vivant. Il y a là une voie encore toute inexplorée, mais qui semble appelée à devenir une des branches les plus fécondes de la chimie pathologique.

Deux travaux, l'un de M. Roger (2), l'autre de M. Marmier (3), marquent une première étape dans cette voie : ces auteurs ont constaté que la bactéridie charbonneuse détruit le glycogène *in vitro* et que, parallèlement, le glycogène disparaît du foie des animaux qui succombent à l'infection charbonneuse. De telles données sont certainement de nature à faciliter la compréhension de la physiologie de cette infection. Nous montrerons nous-même, à la fin de ce travail, qu'il paraît exister une relation étroite entre les qualités fermentatives du microbe et sa virulence.

Nous pensons que cet exposé suffit pour montrer l'intérêt

qui s'attache aux recherches de l'ordre de celles qui font l'objet de notre travail.

C'est M. le Dr E. Roux qui a bien voulu nous indiquer ce sujet; il nous a accueilli dans son laboratoire et nous a toujours soutenue de ses bienveillants conseils; nous lui en exprimons ici toute notre reconnaissance.

FERMENTATION DES HYDRATES DE CARBONE

L'action de la bactéridie charbonneuse sur la matière amylacée a été peu étudiée; en dehors des travaux déjà cités, relatifs à son action sur le glycogène, il n'existe, à notre connaissance, que deux autres travaux : l'un de l'abbé Maumus, l'autre de M. J. Noé.

L'abbé Maumus (4) a cultivé la bactéridie :

1° Sur pomme de terre;

2° Sur empois de fécule de pomme de terre.

Les résultats les plus nets, et aussi les plus intéressants, sont ceux qu'il a obtenus dans le second cas, avec l'empois :

48 heures après l'ensemencement, l'empois était entièrement liquéfié et l'essai à la liqueur de Fehling indiquait qu'il s'était déjà formé du sucre; après 4 jours, le liquide contenait encore du sucre réducteur, mais ne se colorait plus en bleu par l'iode et, par conséquent, ne contenait plus d'amidon. Après ou 7 jours, le sucre avait totalement disparu.

Ces résultats ne sont pas absolument en accord avec les nôtres, mais les différences sont d'ordre secondaire et peuvent tenir à la diversité des races de bactéridie ou aux méthodes de culture.

Les points essentiels établis par l'abbé Maumus sont :

1° La bactéridie charbonneuse liquéfie l'amidon et le transforme en sucre;

2° Elle consomme le sucre ainsi formé.

M. J. Noé (5) a trouvé des résultats un peu différents avec l'inuline : l'inuline est saccharifiée, transformée en lévulose, mais celui-ci ne serait pas attaqué.

A vrai dire, il ressort seulement des expériences de M. Noé que le lévulose n'est pas détruit entièrement dans les limites de l'expérience, et que le liquide conserve jusqu'au bout la propriété de réduire la liqueur cupro-potassique.

On n'a pas été plus loin, et on n'a pas recherché quels étaient les produits qui prenaient naissance aux dépens de l'amidon, ou mieux, du sucre.

C'est cette étude que nous avons entreprise.

Nous avons commencé par répéter les expériences de l'abbé Maumus, en ensemençant la bactéridie sur de l'empois de fécule.

Mais, afin de donner au microbe une quantité d'azote permettant une culture plus abondante, et, par conséquent, une destruction d'une quantité plus grande d'hydrates de carbone, nous avons gélifié la fécule dans du bouillon de veau neutre et peptonisé à 1 0/0.

Pour obtenir des empois bien homogènes, et sur lesquels la liquéfaction marche d'une façon régulière, il est nécessaire de prendre quelques précautions : 150 c. c. de bouillon étaient introduits dans des fioles à fond très plat, au fond desquelles ils occupaient une épaisseur maximum de 1/2 centimètre; on y ajoutait 7 gr. 5 d'amidon de pomme de terre, et on agitait. Puis, les fioles, bouchées au coton, étaient plongées dans l'eau bouillante, et agitées continuellement; dès que la température du bouillon était suffisamment élevée, l'amidon se gélifiait, donnant un empois parfaitement homogène. On maintenait les fioles une demi-heure à 100°, pour laisser échapper les bulles d'air qui restaient emprisonnées dans l'empois; on stérilisait alors à l'autoclave, par chauffage d'une demi-heure à 120°, en ayant soin de n'élever la température que très lentement.

Si on opère sans ces précautions, on n'obtient que des empois grumeleux et, pendant la stérilisation, le coton qui bouche les fioles est presque toujours projeté.

Les fioles ainsi préparées étaient ensemencées, puis mises à l'étuve à 35°.

Au bout de quelques heures, on voyait la liquéfaction commencer autour des points où était tombée la semence; après 1 jour ou 2, elle était toujours complète.

Déjà 12 heures après l'ensemencement, alors qu'une grande partie de l'amidon est encore non liquéfiée, l'essai à la liqueur de Fehling indique la présence d'une assez forte proportion de sucre réducteur; nous ne nous sommes pas préoccupé de rechercher la nature du sucre formé, parce que cette question avait été tranchée par M. A. Fernbach au cours d'expériences

inédites qu'il a bien voulu nous communiquer, et que nous rapporterons plus loin.

M. A. Fernbach a trouvé que, dès les premières 12 heures de culture, il y avait formation de glucose et de maltose.

Pendant les premiers jours, la proportion du sucre réducteur, que nous évaluons globalement en glucose, va en augmentant :

Sucre pour 100 c. c. de culture :

Après 12 heures	traces
Après 24 —	0gr,2
Après 48 —	0gr,8

En même temps on constate que le liquide devient acide. et cette acidité augmente pendant les premiers jours. Dans le tableau ci-dessous, l'acidité totale est évaluée en acide acétique :

Acidité totale après 24 heures	0gr,20
— — — 40 —	0gr,26
— — — 5 jours	0gr,35

Dans l'acide ainsi formé, nous avons recherché les acides volatils par la méthode des distillations fractionnées indiquée par M. E. Duclaux (6).

Les nombres fournis correspondent à de l'acide acétique à peu près pur, mais celui-ci ne représente qu'une partie de l'acidité totale évaluée directement.

Il y a donc, dès le début de la culture, formation d'un acide fixe et d'un acide volatil.

Pour rechercher la nature de ces acides, il fallait en avoir des quantités notables ; dans nos cultures, leur formation s'est très vite arrêtée.

Nous avons pensé que l'acidité croissante du milieu gênait le développement de la bactéridie, et nous avons repris nos expériences en ajoutant à l'empois d'amidon une quantité de craie suffisante pour saturer l'acide au fur et à mesure de sa formation.

Le carbonate de calcium était intimement mélangé à la fécule. et la poudre était introduite dans les fioles de bouillon :

Bouillon de veau	150 c. c.
Fécule	7gr,5
C^{o3} Ca	2gr,5

En opérant comme nous l'avons indiqué ci-dessus, on

obtient des empois homogènes, dans lesquels le carbonate de calcium est réparti uniformément.

On a ensemencé comme précédemment et mis à l'étuve à 35°.

Après un temps de culture déterminé, la fiole était enlevée de l'étuve; on tuait les bactéridies par un chauffage de un quart d'heure à 100° et on filtrait. Le liquide filtré, additionné des eaux de lavage du résidu, était concentré; une partie de ce liquide servait au dosage de la chaux totale en solution, une autre partie à la recherche des acides volatils.

Pour doser la chaux, nous avons précipité par l'oxalate d'ammonium et l'ammoniaque; le précipité, lavé à l'eau distillée bouillante et séché, était pesé et compté comme $(C^2O^4)^2Ca$, H^2O.

Pour la recherche qualitative et quantitative des acides volatils, nous avons toujours employé la méthode de M. Duclaux.

Bactéridie sporogène virulente et amidon. — Une série de fioles, ensemencées avec une bactéridie virulente, a été cultivée à 35° et étudiée au bout de temps variables.

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus : les nombres inscrits dans la colonne « acide fixe » représentent, évalué en acide lactique, l'acide nécessaire pour saturer la chaux dissoute, abstraction faite de celle qui est unie à l'acide volatil.

DURÉE de la culture	ESSAI A LA LIQUEUR DE Fehling.	ESSAI A L'IODE	ACIDE FIXE (évalué en acide lactique)	ACIDE VOLATIL (évalué en acide acétique)	NATURE de l'acide volatil.
5 jours	Réduction	Coloration bleue	1,87	0,73	Acide acétique
9 —	0,80 de glucose pour toute la culture.	— —	3,21	1,15	— —
22 —	pas de réduction	— —	2,59	1,78	— —
71 —	—	— —	traces	0,13	— —
85 —	—	— —	0	0,86	— —
197 —	—	pas de coloration	0	0,12	— formique

Nous voyons donc, d'après ce tableau, que, dès le début de la culture, il y a formation de sucre réducteur : celui-ci, très abon-

dant les premiers jours, diminue bientôt, à mesure qu'augmente la quantité d'acides formés : dans nos expériences, contrairement à ce qu'a observé l'abbé Maumus, l'amidon ne disparaît pas complètement, le liquide contient encore des résidus colorables en bleu par l'iode. Il est facile de se rendre compte que les portions les plus labiles de l'amidon sont d'abord saccharifiées, puis le sucre est détruit; les portions les plus résistantes de l'empois, celles qui correspondent aux parties les plus cohérentes des granules, ne sont attaquées que plus lentement. L'acide fixe est, comme le sucre, un terme de transition; il domine dans les premiers temps de l'opération, et on ne le trouve plus ensuite; il correspond à une période d'abondance. Tant que le sucre est en excès, la bactéridie s'arrête dans sa combustion au terme acide lactique; quand le sucre manque, elle attaque celui-ci et finit par le faire disparaître entièrement.

Les nombres de la colonne 4 montrent que l'acide acétique, lui aussi, est brûlé, quand la nourriture devient rare; il disparaît à son tour. On s'expliquerait mal pourquoi le microbe s'attaque ainsi à l'acide lactique et à l'acide acétique, qui représentent certainement pour lui des aliments inférieurs, tandis qu'il reste encore de l'empois non attaqué; mais il y a lieu de rappeler ici les notions introduites dans la science par M. E. Duclaux (7) et par M. le Dr H. Pottevin (8) sur la nature de l'amidon et de l'empois.

L'amidon est composé de portions plus ou moins compactes; l'empois est son image, et les portions d'amidon qui restent inattaquées après le 5e jour de culture sont très différentes de celles qui ont été détruites : tandis que les premières étaient d'une saccharification facile, les dernières résistent à l'amylase sécrétée par le ferment et ne se transforment que lentement. C'est pour cela que la bactéridie en est réduite, en attendant, à manger ses restes.

Nous voyons aussi que les propriétés comburantes de la bactéridie sont très énergiques puisque, en fin de compte, elle brûle complètement les aliments hydrocarbonés. Nous reviendrons plus loin sur ce point, et nous montrerons qu'après un temps assez long toute la chaux, qui était primitivement dissoute dans la culture à l'état d'acétate ou de lactate, se retrouve à l'état de carbonate.

Dans le tableau que nous avons donné pour résumer nos expériences, nous avons exprimé l'acide fixe en acide lactique; c'est qu'en effet celui-ci est le seul acide fixe qui prenne naissance en quantité notable dans les cultures.

EXPÉRIENCE

On a ensemencé 5 fioles contenant chacune :

Bouillon........................	150 c. c.
Fécule..........................	7 grammes.
Carbonate de calcium............	$2^{gr},5$

Au bout de trois semaines, on a repris et mélangé le contenu des fioles; les dosages des acides fixes et volatils ont donné :

Acide fixe (exprimé en acide lactique)........	$19^{gr},03$ par litre.
Acide volatil (exprimé en acide acétique)....	$5^{gr},47$ —

La moitié du liquide a été évaporée à consistance de sirop, puis additionnée d'une quantité d'acide sulfurique juste suffisante pour précipiter la chaux; on a fait bouillir et on a filtré. Le liquide filtré a été épuisé par l'éther; après évaporation de l'éther, il est resté un liquide acide qui, saturé par l'oxyde de zinc, a donné un sel très soluble dans l'eau chaude, peu soluble dans l'eau froide : ce sel, purifié par plusieurs cristallisations, avait au microscope l'aspect caractéristique du lactate de zinc.

Le sel ainsi obtenu a été desséché à l'étuve à 45°, puis chauffé à 140° jusqu'à poids constant : il a perdu ainsi 18.02 0/0 d'eau.

Calciné, il a donné 34 0/0 d'oxyde de zinc; on se trouve donc en présence du lactate de zinc ordinaire (lactate inactif).

Donc, l'acide fixe que nous trouvons au début de la fermentation est de l'*acide lactique inactif*.

Expériences de M. A. Fernbach. — M. A. Fernbach a étudié l'action de la bactéridie charbonneuse sur la dextrine et sur le maltose.

« *Amidon.* — Lorsque la bactéridie virulente, puisée dans le sang d'un cobaye qui vient de mourir du charbon, est introduite dans un empois d'amidon additionné de craie et de bouillon dilué (fécule, 10 grammes, craie, 4 grammes; 150 c. c. bouillon de veau 1/3), la liquéfaction de l'amidon est très rapide, et au bout de 24 heures, le liquide ne se colore plus sensiblement par l'iode. Il se produit un acide fixe, acide lactique, et des acides volatils. Au début de la culture, ces acides volatils sont presque

exclusivement constitués par de l'acide formique. Au bout de 2 ou 3 jours, cet acide est mélangé d'acide acétique en proportion notable. Ce dernier ne tarde pas à devenir prédominant. Au bout de 5 jours, il ne reste presque plus d'acide formique, et au bout d'un mois on ne trouve plus que de l'acide acétique pur. »

Il y a, entre les résultats obtenus par M. A. Fernbach et les nôtres, une légère divergence qui porte sur la nature de l'acide volatil formé dans les premiers moments de la culture.

Dans la série d'expériences que nous avons rapportée, le premier ballon étudié l'avait été après 5 jours de culture: M. Fernbach trouvant de l'acide formique dès les premières 24 heures, nous avons recommencé nos essais pour étudier la culture plus près de son début.

Nous donnons ci-dessous les nombres fournis par les distillations fractionnées des acides volatils correspondant à ces essais.

AGE DE LA CULTURE		
12 heures.	36 heures.	5 jours.
—	—	—
16,9	11,04	7,4
28,7	20,7	15,4
38,8	28,9	23,1
45,6	37,2	31,2
54,08	46,9	39,8
60,8	55,2	49,07
69,2	64,8	59,8
77,7	74,5	70,2
87,8	86,9	83,01
100,0	100,0	100,0

On voit, en comparant avec les nombres relatifs aux divers acides purs, que, dans les premiers jours de la culture, la courbe qui représente les nombres des distillations fractionnées se placent entre la courbe de l'acide butyrique et celle de l'acide acétique: elle est d'abord au-dessus de la courbe de l'acide propionique, puis au-dessous, ce qui correspondrait à un mélange d'acide acétique et d'acide butyrique.

A mesure que la culture se prolonge, l'acide acétique domine; il existe seul à partir du 5e jour et reste seul pendant plusieurs semaines.

Comme M. Fernbach, nous trouvons que l'acide volatil produit tout au début de la culture disparaît ensuite pour faire place à l'acide acétique: mais, dans nos cultures, cet acide initial n'était pas de l'acide formique. Cette légère divergence entre nos résultats et ceux de M. Fernbach doit, sans aucun doute, être

attribuée à ce fait que nous n'avons pas opéré sur la même race de bactéridies.

Bactéridie et bouillon seul. — Dans le bouillon seul, non additionné d'amidon, la bactéridie a donné, dans les mêmes conditions de culture, une petite quantité d'acide volatil, qui a été de l'acide acétique, mélangé, vers la fin, d'un peu d'acide supérieur. La quantité totale d'acide volatil obtenue dans ce cas est toujours très petite par rapport à celle que l'on obtient dans les cultures similaires additionnées d'amidon.

Bactéridie sporogène virulente, atténuée, bactéridie asporogène et amidon. — La bactéridie charbonneuse est un des microbes les plus anciennement et les mieux étudiés; on possède aujourd'hui, dans les laboratoires, diverses races [vaccins (10), charbon asporogène (11)] qui dérivent de la bactéridie virulente par une filiation simple.

Il y aurait évidemment intérêt, au double point de vue physiologique et pathologique, de savoir à quelle variation dans les fonctions fermentatives se rattachent les variations dans les fonctions sporulatrices ou virulentes. Dans cet ordre d'idées, nous avons cherché comment se comportaient, vis-à-vis de l'amidon, les bacilles charbonneux de différentes espèces, d'une part, les diastases qu'ils sécrètent et au moyen desquelles ils saccharifient l'amidon, d'autre part.

Nous avons préparé comme précédemment un certain nombre de fioles contenant :

Bouillon..	150 c. c.
Fécule..	7 grammes.
Carbonate de calcium........................	2gr,5

Ces fioles ont été divisées en 3 séries qui ont été ensemencées simultanément :

1° Série A, avec bactéridies provenant d'une vieille culture en gélose qui ne tuait plus le cobaye;

2° Série B, avec le sang d'un cobaye mort du charbon en 24 heures;

3° Série C, avec une culture de charbon asporogène virulent.

Les cultures de ces 3 séries, examinées à intervalles réguliers, ont donné :

DURÉE de la culture.			ESSAI à la liqueur de Fehling.			ACIDE FIXE (évalué en acide lactique)			ACIDE VOLATIL (évalué en acide acétique)		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
8	8	8	0 réduct.	0 réduct.	1,39 gluc.	2,81	3,15	2,41	0,51	0,65	1,05
»	15	15	»	d°	0 réduct.	»	4,04	3,30	»	1,64	1,71
21	21	21	0 réduct.	d°	d°	3,97	2,08	4,55	1,05	1,82	1,69

Dans les trois cas, on trouve les mêmes acides, et l'allure du phénomène reste la même.

Bactéridie charbonneuse et amidons divers. — Toutes les expériences qui précèdent ont été effectuées avec de l'amidon de pomme de terre. Nous nous sommes demandé si la bactéridie attaquerait dans les mêmes conditions des amidons d'origines différentes, et nous avons essayé les amidons de riz, de froment, de manioc.

Ces amidons ont été ajoutés au bouillon dans les mêmes porportions que l'amidon de pomme de terre.

Dans tous les cas l'acide volatil a été de l'acide acétique.

Le tableau ci-dessous résume ces expériences :

	Durée de la culture.	Essai à l'iode.	Essai à la liqueur de Fehling.	Acide fixe (évalué en acide lactique).	Acide volatil (évalué en acide acétique).
Froment.	16 jours.	Coloration violacée.	Pas de réduction.	4,06	1,82
Manioc..	14 »	—	—	2,69	0,91
Riz......	18 »	—	—	4,01	1,27

Avec la dextrine, M. A. Fernbach a vu que celle-ci était d'abord transformée en glucose ; le glucose disparaissait à son tour. L'acide formique, formé d'abord, disparaît rapidement ; après 24 heures et jusqu'à la fin de la culture on ne trouve plus que de l'acide acétique.

Si nous rapprochons ces résultats de ceux obtenus par M. Roger avec le glycogène, par M. Noé avec l'inuline, nous

voyons que la bactéridie trouve un bon aliment dans les matières amylacées les plus diverses, tant animales que végétales.

Nous allons constater qu'elle attaque aussi facilement les sucres.

Bactéridie charbonneuse et sucres. — Nous avons opéré sur le maltose, le glucose, le saccharose.

Pour cela, nous avons préparé des milieux avec :

Bouillon	150 c. c.
Sucre	4gr,5
Carbonate de calcium	0gr,5

Nous avons pris comme semence une culture virulente sur gélose.

Dans tous les cas, l'acide volatil a été de l'acide acétique.

	Durée de la culture.	Sucre consommé.	Acide fixe (évalué en acide lactique).	Acide volatil (évalué en acide acétique).
Glucose	10 jours	—	0,36	0,27
	45 —	1gr,22	0,64	0,77
	87 —	1,54	0,74	1,13
Maltose	10 —	—	0,70	0,51
	45 —	1,83	0,44	0,94
	87 —	2,15	0,78	1,37
Saccharose	10 —	—	0,50	0,43
	45 —	—	0,72	0,93
	87 —	—	0,44	0,91

Nous voyons en somme que les sucres se comportent comme les amidons ; ils sont détruits, avec formation d'un acide fixe qui n'est lui-même qu'un produit intermédiaire ; cet acide fixe est attaqué à son tour et fait place à de l'acide acétique qui est lui-même détruit en fin de compte.

M. Fernbach a étudié l'action de la bactéridie sur le maltose, en présence de peptone (2 0/0) et craie :

« Le maltose est transformé en glucose sans que la transformation soit jamais intégrale ; l'acide formique persiste bien plus longtemps qu'avec l'amidon : on le retrouve encore, presque

pur, après 4 jours. Au 6e jour, l'acide acétique apparaît; au 13e jour, l'acide formique a diminué, mais il en reste encore beaucoup, et il en reste encore après un mois, alors que la consommation du maltose est presque complète. Vers la fin de la culture, le glucose, qu'on trouvait au début, semble avoir entièrement disparu.

« Ce fait semble indiquer que le glucose est gênant; des expériences de culture sur glucose ont montré que la bactéridie ne le consommait qu'avec une extrême lenteur. »

Bactéridie et lactate de calcium. — Nous avions pensé compléter utilement notre étude en faisant consommer par la bactéridie du lactate de calcium que nous lui offrions en nature. Nous n'avons pas réussi à obtenir la destruction du lactate de calcium en ensemençant directement la bactéridie dans le bouillon additionné de lactate; nous avons été plus heureuse quand nous avons ajouté le lactate de calcium dans la culture déjà poussée.

Expérience. — Deux litres de bouillon, additionné de 5 grammes de peptone, ont été ensemencés et mis à l'étuve; au bout de 6 jours, la culture étant bien développée, nous avons prélevé avec pureté 100 c. c. du liquide.

Puis, au liquide restant, nous avons ajouté 9gr,32 de lactate de calcium en solution dans 150 c. c. d'eau (la solution ayant été stérilisée préalablement).

Les 100 c. c. de culture prélevés ont été saturés de carbonate de calcium, et ont servi à déterminer les acides qui étaient déjà formés au moment de l'addition du lactate de chaux; ils ont donné :

Acide volatil (rapporté à la culture totale)................ 1gr,2

Au bout de 3 mois, on a repris la culture et on y a dosé :

1° La quantité de chaux en solution;

2° Les acides volatils.

On a trouvé que l'acide volatil était de l'acide acétique et qu'il y en avait 4gr,92 dans toute la culture, ce qui correspond à peu près à la quantité (5 grammes) qui serait nécessaire pour saturer la chaux dissoute.

L'acide lactique a donc été à peu près entièrement détruit. Nous en retrouvons une petite quantité sous forme d'acide acétique, mais la plus grande partie a subi une dégradation plus

profonde : en effet, le fond des ballons de culture était tapissé par un abondant dépôt. Nous avons recueilli ce dépôt, nous l'avons lavé à l'eau et séché : il pesait 2gr,28.

Traité par l'acide acétique, il faisait effervescence; on a ajouté de l'acide acétique jusqu'à dissolution de tout ce qui était soluble : la portion insoluble dans l'acide acétique pesait 0gr,16.

Si la portion entrée en solution était du carbonate de calcium, il y en avait (2,28-0,16) 2gr,12. Comme contrôle, la solution acétique a été évaporée : le sel séché pèse 2gr,42, ce qui est bien le poids d'acétate de calcium correspondant à 2gr,12 de carbonate de calcium.

Si donc nous considérons le carbone qui a été mis à la disposition de la bactéridie sous la forme lactate de calcium, nous trouvons qu'il correspondait :

Au début, à	2gr,17	sous	forme	d'acide lactique.
À la fin à..	0,43	—	—	lactique.
	1,49	—	—	acétique.
	0,25	—	—	carbonique.

AMYLASES DE LA BACTÉRIDIE

Si la bactérie charbonneuse est capable de liquéfier et de saccharifier l'amidon, c'est qu'elle sécrète une amylase. Nous nous sommes proposé d'isoler et d'étudier à part les amylases fournies par les diverses races de bactéridies.

M. le Dr Malfitano (expériences encore inédites), qui avait entrepris une étude analogue sur les diastases protéolytiques de la bactéridie, a bien voulu mettre à notre disposition des macérations de corps de microbes, dont nous nous sommes servie pour nos expériences.

Ces microbes provenaient de cultures sur gélose qui étaient raclées, mises à macérer dans l'eau stérile pendant deux jours, à la température de 35°, puis filtrées à la bougie Chamberland.

Expérience. — Nous avons préparé des tubes contenant chacun 5 c. c. d'empois à 4 0/0 de fécule et stérilisés à l'autoclave à 120°.

Chacun de ces tubes a reçu les proportions suivantes des diverses solutions diastasiques fraiches ou chauffées :

I.	1 c. c.	diastase	active	+ 2 c. c.	diastase	chauffée.
II.	2 —	—	—	+ 1 —	—	—
III.	3 —	—	—	+ 0 —	—	—

Et nous avions 3 séries de ces tubes :

Série A.	Diastases provenant de bactéridies	sporogènes virulentes.	
Série B.	—	—	— du 2e vaccin.
Série C.	—	—	— du 1er vaccin.

Les macérations de corps de microbes avaient été étendues d'eau de façon à contenir toutes la même proportion d'extrait sec. Dans ces conditions, les tubes de la série A, par exemple, se trouvent avoir reçu des quantités de diastase provenant de poids égaux de corps microbiens virulents.

Les mélanges diastasifères étaient ajoutés à l'empois non encore totalement refroidi (température 45° à 50°) ; celui-ci constitue alors une masse demi-fluide à laquelle le liquide ajouté se mélange aisément ; après complet refroidissement, le mélange forme un empois solide. On abandonnait à la température de 35°.

Pour éviter l'intervention des infiniment petits, l'eau qui avait servi à faire l'empois, aussi bien que celle qui avait servi pour la macération, était de l'eau saturée de thymol.

Après 24 heures de séjour à l'étuve, le contenu de tous les tubes avait été liquéfié ; ceci indiquait qu'il y avait dans toutes les macérations de l'amylase active (des tubes témoins étaient restés inaltérés).

Pour apprécier les quantités d'amylase fournies par des poids égaux de bactéridies virulentes et vaccinales, il n'y avait qu'à mesurer quantitativement l'action produite par leurs macérations. Sans doute, il n'y a pas proportionnalité absolue entre la quantité d'amidon transformé en dextrine en 24 heures et la quantité de diastase agissante; mais on peut admettre, toutes choses égales d'ailleurs, que ces deux quantités varient dans le même sens.

Nous avons donc pris les tubes de la série II et nous avons ajouté à chacun d'eux un volume d'alcool absolu égal au volume de la solution amylacée qu'il contenait ; nous avons ainsi précipité les produits de transformation de l'amidon par l'alcool à 50 0/0. Le poids de précipité obtenu dans chaque tube mesure la quantité de substances amylacées qui est encore à l'état de dextrines hautes, insolubles dans l'alcool à 50 0/0; il est en raison inverse de l'activité diastasique de la macération correspondante ; nous avons trouvé :

	Amidon total.	Dextrines précipitées par l'alcool à 50 0/0.
	—	—
Bactéridie virulente.....	0,20	0,11
2e vaccin	0,20	0,06
1er vaccin..............	0,20	0,05

Nous voyons que la quantité de diastase fournie par la bactéridie virulente est inférieure à celle que fournissent, — toutes choses égales d'ailleurs, — le 1er et le 2e vaccin.

M. le Dr Malfitano a trouvé que des poids égaux de bactéridies virulentes et de vaccin donnaient, dans les mêmes conditions, des quantités différentes de diastases protéolytiques, la bactéridie virulente étant celle qui en donne le plus.

C'est, nous le voyons, le contraire de ce qui se passe pour la diastase amylolytique.

CONCLUSIONS

La bactéridie charbonneuse attaque facilement les matières amylacées et les sucres ; aux dépens de chacun d'eux, elle donne un acide fixe (acide lactique) et un acide volatil qui a été, dans tous les cas, — sauf dans les tout à fait premiers moments de la culture, — de l'acide acétique.

Quand l'aliment hydrocarboné devient rare (sucre) ou difficile à attaquer (amidon), la bactéridie s'attaque à l'acide lactique formé et le consomme en deux temps : elle laisse comme résidu de l'acide acétique qui est lui-même détruit plus tard, si bien que tout le carbone de l'aliment hydrocarboné offert primitivement se trouve ramené à l'état d'acide carbonique.

Au point de vue de leurs propriétés protéolytiques et amylolytiques, la bactéridie virulente et les vaccins qui en dérivent se comportent de façons inverses ; les propriétés protéolytiques dominent chez les espèces virulentes, les propriétés amylolytiques dominent chez les espèces atténuées.

BIBLIOGRAPHIE

1. Dr Louis Martin, Production de la toxine diphtérique. *Annales Institut Pasteur*, p. 26.

2. Dr Roger, Glycogénie dans l'infection charbonneuse. *C. R. Ac. Sc.*, 1893, II, 117, p. 488.

3. Dr Marmier, Sur la toxine charbonneuse. *Annales Institut Pasteur*, 1895, p. 533.

4. Abbé Maumus, Transformation de l'amidon végétal en sucre par le bacillus anthracis. *C. R. Soc. Biol.*, 1893, p. 107.

5. M. J. Noé, Action de la bactéridie charbonneuse sur l'inuline. *C. R. Soc. Biol.*, 1894, p. 750.

6. 9. M. E. Duclaux, Sur le dosage des acides volatils. *Annales Institut Pasteur*, 1895, p. 265.

7. M. E. Duclaux, *Microbiologie*, t. II, p. 391 et suivantes.

8. Dr H. Pottevin, Saccharification de l'amidon. *Annales Institut Pasteur*, 1899, p. 665.

10. Pasteur, Chamberland et Roux, De l'atténuation des virus et de leur retour à la virulence. *Ac. des Sciences*, 28 février 1881.

Pasteur, Chamberland et Roux, Le vaccin du charbon. *Ac. des Sciences*, 21 mars 1881.

11. Dr E. Roux, Bactéridie charbonneuse asporogène. *Annales Institut Pasteur*, 1890, p. 25.

NOTE SUR UN NOUVEL APPAREIL A CONTENTION

Par le Dr L. DEBRAND.

(Travail du laboratoire de M. Roux.)

Si l'on veut manier aisément un animal sur lequel on va pratiquer une opération, il importe que la tête de celui-ci soit immobilisée dès le début des manœuvres contentives. Partant de ce principe, et m'inspirant des résultats obtenus par M. Malassez avec son appareil, lequel réalise la contention du chat, du rat, du cobaye et du lapin, j'ai imaginé un appareil permettant d'annihiler d'emblée toute résistance chez l'animal, afin que l'opérateur puisse en quelques instants, sans aide et sans risquer d'être griffé ni mordu, mettre en position d'expérience tous les animaux de laboratoire, souris, rats, cobayes, lapins, pigeons, poules, oies, singes, chats et chiens.

Une description détaillée serait superflue, car la figure ci-jointe indique clairement la disposition et le mécanisme des organes constituant l'appareil. Je me contenterai de donner quelques indications générales sur le *modus agendi* applicable aux divers cas de la pratique.

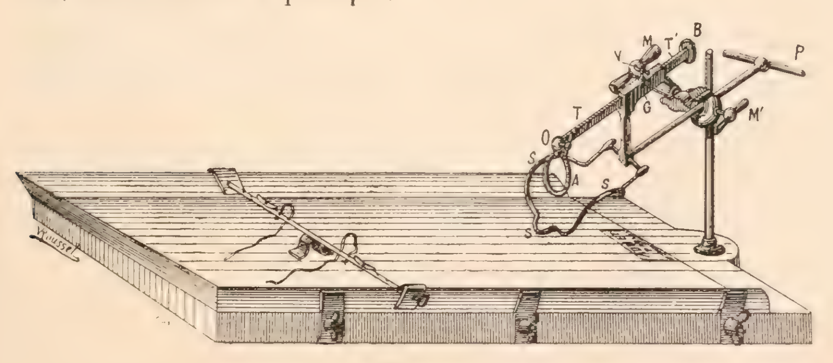


Fig. 1.

Un animal doit pouvoir être immobilisé dans trois positions différentes : sur le ventre (A), sur le dos (B), sur le flanc (C).

A. En cas d'intervention sur la boîte cranienne (trépanation,

inoculation intracérébrale), sur les oreilles (inoculation des veines marginales), sur la colonne vertébrale, etc, il suffira, l'animal gardant sa position naturelle, d'immobiliser la tête de celui-ci dans le serre-tête S S S. Rien de plus simple.

L'appareil étant placé dans sa position normale, c'est-à-dire, la branche horizontale formant un angle droit avec la tige carrée verticale, on fixe sur la tige carrée T. T', mobile dans la glissière G, un anneau A proportionné à la dimension du museau de l'animal, et de forme identique aux museaux métalliques employés par M. Malassez. On desserre la vis V et l'on tire la tige en arrière, de façon à démasquer entièrement le serre-tête. On présente alors l'animal. Ici le mode de préhension variera selon l'espèce.

Souris, rats, cobayes, pigeons. — Le même anneau (n° 1) convient à la souris, au rat, au pigeon. Pour ces deux derniers, il faut raccourcir la tige portant l'anneau. A cet effet on l'introduit en O jusqu'à l'index, représenté par une flèche sur une des faces latérales. Pour la souris au contraire, la tige sera fixée à son extrémité, de façon que la circonférence inférieure de l'anneau soit sur le même plan que l'encoche du serre-tête. Pour le cobaye on prend le n° 2 ou 3. On saisit alors l'animal de la main droite, en ayant soin de rentrer ses pattes, afin qu'il ne puisse pas s'en faire un point d'appui, et contrarier ainsi la rapidité de la manœuvre. On introduit le museau dans l'anneau A, en même temps que l'on pousse le bouton B de la main gauche, et la nuque vient tout naturellement s'encadrer dans l'encoche du serre-tête. On lâche l'animal, l'index gauche pressant toujours sur le bouton B; on serre la vis V de la glissière et l'opération est terminée [1].

Si l'on avait affaire à un rat blanc indocile ou à un rat gris, il faudrait le présenter à l'appareil avec une pince, comme cela se fait d'ordinaire.

Qu'on me permette d'appeler ici l'attention sur un petit tour de main, fort utile en pratique. Pour que l'encoche du serre-tête coiffe la nuque au-dessous de la protubérance occipitale, condition *sine quà non* pour que l'animal soit solidement maintenu, il faut, dès que le museau est engagé dans l'anneau, soulever vertica-

1. La vis V de la glissière et la vis qui maintient l'anneau au point O doivent être serrées modérément.

lement le corps de l'animal dans sa totalité, comme si l'on voulait mettre la nuque à un niveau plus élevé que le museau.

On fixe l'appareil à la hauteur convenable en le faisant glisser le long de la tige verticale au moyen de la béquille Q, visible seulement sur la fig. 3.

Lapins. — Le lapin est posé sur le plateau, de telle façon que la tête se trouve au-dessous de l'appareil. La main droite plongeant alors dans le serre-tête va saisir les oreilles aussi près que possible de leur base, et soulève la tête jusqu'à ce que le museau soit en regard de l'anneau. Il ne reste plus qu'à pousser

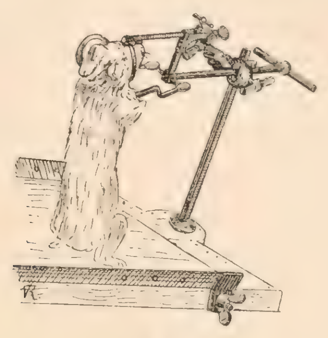


Fig. 2.

le bouton B de la main gauche et l'opération se termine comme ci-dessus. On se sert de l'anneau n° 4.

Pour la trépanation, il faut une stabilité parfaite. Afin de l'obtenir, on fait glisser l'appareil très bas, le long de la tige carrée verticale, puis on diminue la longueur du bras de levier en tirant sur la poignée P, après avoir desserré les deux manettes M, M', que l'on resserre ensuite.

Chats, singes. — Ces animaux étant un peu sauvages et ombrageux, il faut être très prudent et procéder à leur égard avec une grande douceur. Gagner d'abord leur confiance est un temps essentiel de l'opération. On saisit alors la nuque de l'animal solidement, mais sans violence, et l'on introduit le museau dans l'anneau choisi : n° 4 pour le singe, n° 5 pour le chat. On peut prendre la précaution d'envelopper le chat dans une serviette en ne laissant sortir que la tête. Dès qu'il est dans l'appareil, on retire la partie de la serviette recouvrant les pattes

postérieures, on fixe celles-ci et l'on passe aux pattes antérieures.

Cet anneau n° 5, commun au chat et au chien, mérite une description spéciale. C'est un système composé de deux anneaux articulés à l'extrémité de leur plus grand diamètre. L'anneau se fixe au point O, comme les autres. Tout le système est alors vertical. L'anneau mobile, ouvert dans sa partie libre, forme une fourche qu'on relève d'une main, après avoir de l'autre main introduit la tète de l'animal dans le serre-tète. On pousse le bouton B : les branches de la fourche viennent prendre un point d'appui et glisser sur la partie postéro-transversale du serre-tète, maintenant fermement l'animal sous le maxillaire. Cet anneau-jugulaire réduit à l'impuissance l'animal le plus fort (fig. 4.)

Poules. — Même manœuvre. On place l'anneau-jugulaire n° 2 de telle manière que les branches de la fourche glissent de chaque côté de l'encoche. Pour l'oie, il faut allonger le plateau.

Chiens. — Si le chien est de petite taille et a de longues oreilles, on se comporte comme avec le lapin. S'il a les oreilles courtes ou coupées, on agit comme avec le singe. On prend l'anneau-jugulaire n° 5. On allonge le plateau.

Si l'animal est de taille moyenne, il faut, bien entendu, employer un serre-tête plus grand et plus résistant. Le chien étant lourd, il ne serait pas commode de le retourner, si on laissait le serre-tête fixé à l'appareil. Il est donc préférable d'enlever celui-ci de la gorge où le retient la manette M, pour en coiffer la tête du chien. Il va sans dire que les mots petite taille, taille moyenne sont élastiques et dépendent de l'appréciation individuelle. D'un autre côté la puissance de l'appareil est naturellement limitée : il ne résisterait pas aux efforts d'un gros chien; mais il est rare qu'on en fasse usage dans les laboratoires. Si l'on avait affaire à des animaux de taille exceptionnelle, on se servirait d'un appareil beaucoup plus fort, construit spécialement pour les animaux de forte taille.

B. Veut-on maintenant fixer l'animal sur le dos (laparotomie, etc.)? On remonte d'abord l'appareil à l'extrémité de la tige verticale. La manœuvre comporte alors deux temps. Le premier (A) vient d'être décrit dans l'alinéa précédent. Le second

consiste en ceci : saisir la poignée P de la main gauche, desserrer légèrement les deux manettes M, M de la main droite, prendre l'animal par les reins et, par une action synergique des deux mains, faire subir à l'appareil et à l'animal un mouvement de rotation : l'animal est alors sur le dos. Immédiatement on serre à fond les deux manettes M, M [1]. Bien entendu, pendant cette manœuvre, l'appareil est devenu vertical ou plutôt légèrement oblique (fig. 3). Pour fixer les pattes de l'animal on peut faire usage du lacs de Claude Bernard : c'est un simple ruban que l'on passe dans les trous ménagés sur les bords du plateau. Une ficelle quelconque remplira le même but, mais ce temps

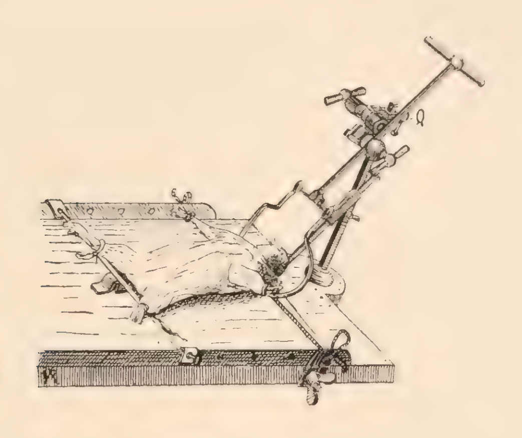


Fig. 3.

de l'opération sera facilité et très abrégé si l'on emploie le dispositif représenté dans les figures. Les pattes introduites dans l'anneau formé par une cordelette sont étendues sur la barre métallique, où sont pratiqués des trous permettant le passage de la ficelle, on tire sur celle-ci et on l'enroule sur le petit arrêt. Deux petites courroies, terminées par une boucle et fixées à la barre pourraient remplacer cette ficelle. La barre a été préalablement arrêtée en un point du plateau commandé

1. Il est important de toujours serrer à fond M, M', lorsque l'animal est placé sur l'appareil ; de cette façon on obtient une immobilité absolue. Nous avons vu plus haut, au contraire, que le serrage de V et de O doit être peu énergique.

par la longueur de l'animal. Cette barre glisse sur les bords verticaux du plateau au moyen de deux curseurs à vis[1].

Si, à ce moment, l'animal exécute encore quelques mouvements, c'est qu'il n'est pas suffisamment tendu : il suffit d'accentuer la verticalité de l'appareil. On desserre les manettes M, M', on tend l'animal, et l'on serre de nouveau à fond M, M'.

Généralement il n'est utile d'attacher les pattes antérieures que si l'on opère vers l'extrémité céphalique de l'animal, dans les autres cas (laparotomie, etc.), il suffit de fixer les pattes postérieures. L'animal prend alors de lui-même un point



Fig. 4.

d'appui sur l'appareil et ne cherche pas à atteindre l'opérateur.

Lorsqu'on pratique une opération sur le cou (trachéotomie, prise de sang,) il faut allonger un peu le cou de l'animal. Pour cela, les pattes antérieures et postérieures étant fixées, on desserre M, M'; on fait légèrement basculer l'appareil, en tirant sur la poignée. Lorsqu'on juge la tension du cou suffisante, on serre à fond M, M'.

C. Pour mettre l'animal sur le côté, on imprime à la poignée un mouvement de rotation dans le sens désiré et l'on fixe l'animal dans cette position.

1. Chez le chien, les pattes antérieures seront fixées d'une manière spéciale. Les deux cordelettes seront croisées comme des bretelles sous le dos du chien, de telle façon que l'anneau formé par l'extrémité de chacune d'elles aille prendre la patte du côté opposé. On tire sur la cordelette, et lorsque celle-ci entoure la racine du membre, on la fixe au petit arrêt : le chien sera ainsi solidement assujetti sur le dos. A cause de sa conformation particulière, le chien a toujours tendance à se déjeter sur un côté. C'est pour obvier à cet inconvénient que Cl. Bernard avait imaginé sa gouttière brisée. Dans le cas présent, on se contentera de caler les flancs de l'animal avec deux coins en bois, dont le côté concave et supérieur épousera les contours du chien. C'est un moyen primitif peut-être, mais très efficace. Les pattes postérieures seront fixées comme d'ordinaire. Pour le chien donc il faut employer deux barres de fixation.

Lorsque l'opération est terminée, on libère les pattes, on dévisse la vis V de la glissière, on tire la tige en arrière par le bouton B, pour dégager le museau de l'animal, et celui-ci se remet seul sur ses pattes.

Si l'on veut pratiquer anesthésie le cornet à chloroforme sera suspendu à l'armature de l'appareil et maintenu ainsi à proximité des voies respiratoires.

Au moyen d'un système de fixation particulier l'appareil peut se placer sur un plateau d'autopsie quelconque, mais ce moyen n'est pas à conseiller à cause de la mobilité des rebords du plateau. Il est infiniment préférable de fixer l'appareil sur une planche épaisse : on aura ainsi une stabilité parfaite. La planche sera recouverte : 1° d'un revêtement métallique ; 2° d'un plateau mobile, en zinc ou en cuivre, retenu latéralement au moyen de pattes fixées par des écrous. Ces pattes sont placées de telle sorte que l'appareil peut être allongé d'une longueur égale à la distance qui sépare les pattes du devant de celles du milieu.

Tout étant métallique, le nettoyage et la désinfection sont faciles.

Le plateau peut coulisser facilement sur la planche sous-jacente, car les pattes sont échancrées latéralement, en avant et en arrière, et ces échancrures viennent alternativement emboîter la vis antérieure ou la vis postérieure selon le cas. Ces détails ne se voient pas sur la figure, parce que cette modification est de date récente. Tout d'abord le plateau ne pouvait s'allonger que si on le retirait tout à fait. M. Borrel m'a fait judicieusement remarquer qu'il serait plus pratique de n'avoir pas à soulever le plateau, soit pour l'allonger, soit pour le nettoyer.

La disposition ci-dessus décrite supprime le désidératum signalé.

Il est encore un détail que l'on ne voit pas sur les figures, et que je crois bon d'indiquer. M. Roux qui a bien voulu s'intéresser à mon modeste travail, ce dont je lui suis infiniment reconnaissant, m'a donné le conseil de disposer mon appareil sur une table *ad hoc* Je me suis empressé de réaliser cette excellente idée, et j'ai fait faire une petite table en métal de la grandeur du plateau. Dans son tiers inférieur elle porte une tablette en opaline, sur lequel sont déposés tous les instruments nécessaires au physiologiste. Une planchette mobile sous-jacente au plateau

permet d'avoir sous la main, au moment d'une opération, tout ce dont on a besoin. Au-dessous de la tablette il y a un tiroir contenant les anneaux, le serre-tête du chien, les coins, etc.

Point n'est besoin de faire remarquer que si toute cette technique est longue à décrire, elle est très rapidement exécutée, puisqu'en quelques secondes on peut mettre un animal en position d'expérience. La contention est ainsi réduite à une simplicité telle qu'on a plus vite fait de fixer un animal sur l'appareil que d'appeler un aide.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

Le Gérant : G. Masson.

INSTITUT PASTEUR

COURS D'ANALYSE CHIMIQUE ET BACTÉRIOLOGIQUE

L'Institut chimique nouvellement annexé à l'Institut Pasteur comprend, à côté des laboratoires de recherches théoriques, un laboratoire d'enseignement de l'analyse chimique et bactériologique appliquée à l'étude de tous les matériaux de l'organisme, aussi bien de ceux qui y entrent sous forme d'aliments que de ceux qui en sortent sous forme de produits physiologiques ou pathologiques.

C'est à chaque instant que se posent les problèmes relatifs à cet ordre de questions. Quelle est la valeur hygiénique d'une eau, d'un vin, d'une bière, d'un lait, d'une boîte de conserves, d'un chocolat, etc. ? Comment faut-il faire une analyse d'urine pour qu'elle soit profitable à qui la demande ? Comment faut-il conduire l'étude d'un crachat tuberculeux, d'une fausse membrane diphtérique, pour renseigner le médecin ? Comment un expert dans une grande ville, et, dans une petite, le pharmacien doit-il s'y prendre pour résoudre ces problèmes, qui sont de sa compétence et pour lesquels il est souhaitable qu'on s'adresse à lui ? Comment le chimiste d'une des nombreuses industries de l'alimentation doit-il faire l'étude des matières premières qu'il met en œuvre et du produit qu'il fabrique ? Voilà l'enseignement que nous voudrions répandre.

Il existe déjà, mais à l'état fragmentaire, et disséminé dans divers laboratoires. Il y a, croyons-nous, intérêt à lui donner l'organisation régulière et méthodique qui lui manque. Un laboratoire où tous les élèves marchent du même pas, parce qu'ils appliquent les mêmes procédés et ont auprès d'eux le nombre de moniteurs nécessaires pour leur permettre de ne pas s'égarer, donne un enseignement plus vif, plus rapide et par là plus économique.

Nous ne voudrions pas nous borner à enseigner la pratique des méthodes usuelles. C'est bien quelque chose que d'avoir appris quelles sont les meilleures, et comment on doit les mettre en œuvre pour être sûr du résultat. Il est encore bien plus important de savoir comment on doit interpréter ce résultat. L'enseignement pratique du labora-

toire doit donc être accompagné d'un enseignement théorique, portant surtout sur la critique des méthodes, marquant le degré de la confiance que mérite chacune d'elles, et la sécurité d'affirmation qu'elle permet. N'oublions pas que s'il y a des condamnations pour falsifications qui sont justes, il y en a parfois d'imméritées, parce que juges et experts ont mis une trop grande confiance dans des méthodes qui ne la méritaient pas. Il y a un intérêt social à ce que, seuls, les fraudeurs soient punis.

Enfin, comme la science progresse vite, aussi bien la science bienfaisante que celle des falsifications, il est nécessaire que les élèves du laboratoire soient mis de suite au courant de ses plus récentes acquisitions. A cette nécessité correspondront des séries variées de leçons, faites par des spécialistes, et portant sur les mêmes sujets que les travaux pratiques.

La période scolaire sera de cinq mois, de la rentrée de novembre aux vacances de Pâques. Elle se composera de deux parties :

1er Trimestre. Méthodes bactériologiques ; pratique des ensemencements et des cultures. Analyse des eaux et des boissons.

2e Trimestre. Analyse des matières alimentaires, du lait, de l'urine, des produits pathologiques.

Le coût des inscriptions est de 250 francs par trimestre : on ne s'inscrit pas pour moins d'un trimestre.

Ne pourront être admis que les élèves qui montreront, dès les premières manipulations, qu'ils ont déjà la pratique du laboratoire pour les préparations usuelles, le montage des appareils et les principales réactions de la chimie minérale et organique. En d'autres termes, le laboratoire ne reçoit pas de débutants, qui entraveraient la marche des études.

Le laboratoire sera ouvert tous les jours de midi à six heures du soir, sauf le samedi, où il fermera à trois heures.

Les inscriptions sont reçues, à partir du 15 juin, au sécrétariat de l'Institut Pasteur, 25, rue Dutot. L'ouverture des cours et manipulations aura lieu le lundi 5 novembre 1900. Les convocations se feront d'après l'ordre des inscriptions.

PROGRAMME

DES TRAVAUX DE LABORATOIRE

Ce programme suppose que les élèves ont déjà la pratique du laboratoire pour les préparations usuelles, le montage des appareils, et les principales réactions de la chimie minérale et organique.

MATIÈRES ALIMENTAIRES

Technique bactériologique. — Préparation des milieux de culture. Méthodes usuelles de coloration, emploi du microscope.

Eau. — Étude bactériologique, étude chimique, hydrotimétrie, caractères des eaux potables.

Vin. — Dosage de ses divers éléments, Recherche des falsifications, étude des pratiques commerciales (plâtrage, déplâtrage, etc.).

Bière. — Dosage de ses divers éléments. Recherche des éléments anormaux (succédanés du malt, saccharine, antiseptiques, etc.).

Cidres. — Etude des fermentations diverses qui interviennent dans leur fabrication.

Vinaigres naturels ou artificiels.

Alcools et spiritueux. — Recherche et dosage des éléments mélangés naturellement à l'alcool ordinaire. Etude des principales liqueurs du commerce, rhum, kirsch, absinthe et de leurs éléments essentiels.

Lait. — Examen chimique, microscopique et bactériologique (écrémage, mouillage, pasteurisation, stérilisation, lait condensé).

Beurre. — Méthodes d'analyse, mélange de matières grasses, colorants — Procédés de conservation. Addition d'antiseptiques.

Fromages. — Méthodes d'analyse. Étude des présures, colorants artificiels.

Huiles. — Étude des mélanges.

Viandes. — Examen microscopique, chimique et bactériologique. Viandes diverses, altérations. Principes toxiques.

Céréales, farines, pain. — Etude des divers amidons. Mélanges et falsifications des farines ; étude des pâtes alimentaires.

Café, thé, coca. — Recherche et dosage des principes actifs, étude microscopique. Recherche des falsifications.

Chocolat. — Caractères microscopiques et chimiques. Dosage des éléments. Addition de substances anormales.

Sucre. — Diverses méthodes de saccharimétrie. Mélange de sucres. Sucres bruts, raffinés, mélasses.

Matières sucrées. — Miels, confiseries, sirops. Recherche des falsifications, dextrine, gélatine, etc.

Conserves alimentaires. — Analyse bactériologique et chimique. Recherche des métaux toxiques, étude des falsifications.

Epices et aromates.— Étude des caractères physiques et chimiques, falsifications.

PRODUITS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES

Urines. — Éléments normaux et anormaux. Sédiments et concrétions. Étude chimique et microscopique. Recherche des médicaments éliminés par l'urine.

Salive et suc gastrique. — Composition physiologique et déviations pathologiques.

Crachats; fausses membranes. — Étude au microscope et par les ensemencements ou inoculations. Tuberculose et diphtérie.

Peau. — Étude microscopique des microbes variés qui peuvent s'y implanter. Diverses tricophyties.

Sceaux. — Imp. E. Charaire

14me ANNÉE MAI 1900 N° 5

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

LES SÉRUMS HÉMOLYTIQUES, LEURS ANTITOXINES ET LES THÉORIES DES SÉRUMS CYTOLYTIQUES

Par le Dr JULES BORDET

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

§ I. — Notions complémentaires relatives aux sérums hémolytiques.

Nous nous proposons d'exposer en premier lieu, dans le présent article, quelques notions nouvelles relatives aux sérums antihématiques [1]; ces sérums, on le sait, proviennent d'animaux qui ont été traités par des injections de sang d'une espèce animale étrangère. Ensuite, nous étudierons sommairement les propriétés principales d'une antitoxine capable de s'opposer à l'influence destructive exercée sur des globules rouges par un sérum hémolytique. Pour terminer, nous reviendrons sur les théories qui ont été émises pour expliquer les propriétés cytolytiques des divers immunsérums, et nous rechercherons quelles sont, parmi ces théories, celles que les faits expérimentaux corroborent.

1. Pour désigner les sérums antihématiques, nous emploierons très fréquemment les termes « sérums hémolytiques » ou de préférence « hémotoxines ». Si nous adoptons ce dernier mot, l'antitoxine d'un sérum hémolytique s'appellera « antihémotoxine ». Ces termes sont d'un emploi commode. Ils sont suggérés par M. Metchnikoff, qui, on le sait, appelle spermotoxine le sérum actif vis-à-vis des spermatozoïdes, leucotoxine celui qui détruit les leucocytes. — Le terme général de « sérums cytolytiques » ou « cytotoxiques » désignera les divers immunsérums capables de détruire énergiquement soit des microbes, soit des cellules (globules rouges, etc.).

Nous nous en tiendrons, dans les pages qui suivent, à un exemple unique de sérum hémolytique. Nous choisissons celui que fournissent les cobayes traités par le sang de lapin. C'est le sérum dont nous nous sommes occupé en premier lieu, lorsque nous avons fait connaître les sérums antihématiques. On l'obtient très facilement, les cobayes fournissant un sérum déjà très actif après avoir été soumis à 2 ou 3 injections, sous la peau, de 3-5 c.c. de sang défibriné de lapin. Ce sérum agglutine et détruit les hématies de ce dernier animal, tout en respectant les globules rouges provenant d'animaux différents.

Les propriétés de ce sérum ont été décrites avec détails dans un mémoire antérieur (1898); nous croyons donc inutile de préciser à nouveau le rôle joué dans l'hémolyse par les deux substances que possède un sérum antihématique, à savoir l'alexine[1] ou matière globulicide proprement dite, destructible à 55°, et la sensibilisatrice ou anticorps spécifique (matière préventive), résistant davantage à l'élévation de la température. Nous devons du reste résumer plus loin l'ensemble de ces notions, à propos des théories relatives aux sérums bactéricides ou hémolytiques. Rappelons seulement que l'une de ces substances, l'alexine, se rencontre aussi bien dans le sérum neuf que dans l'immunsérum. Le rôle de la sensibilisatrice est de rendre les globules très sensibles à l'influence cytolytique de l'alexine. Nous croyons inutile de répéter, en décrivant les expériences, que le chauffage à 55° (on chauffe les sérums pendant une demi-heure) détruit toujours complètement les propriétés cytolytiques des divers sérums mentionnés dans cet article.

***

1° *Propriétés dissolvantes d'alexines diverses en présence de la sensibilisatrice.* — On sait que notre hémotoxine (rappelons qu'elle provient du *cobaye* et qu'elle détruit les globules de *lapin*) perd son pouvoir hémolytique lorsqu'on la chauffe à 55°, mais qu'il suffit alors, pour lui rendre son énergie première, de l'additionner de sérum de cobaye neuf; celui-ci pourtant n'est par lui-

1. Nous croyons entièrement inopportun de remplacer par un autre ce terme d'*alexine*, introduit depuis longtemps dans la science par Buchner, employé fréquemment par de nombreux observateurs, et avec lequel ceux-ci se sont familiarisés. D'ailleurs, le mot importe peu, pourvu qu'on sache ce qu'il désigne.

même que très faiblement globulicide. On obtient le même résultat si on remplace le sérum neuf de cobaye par du sérum neuf de lapin : nous avons en effet signalé ce fait assez remarquable, — sur lequel nous reviendrons très fréquemment — que l'alexine du sérum neuf de lapin, laquelle est par elle-même totalement inoffensive pour les globules du même animal, se montre au contraire, lorsqu'elle est associée à notre sensibilisatrice[1], fortement hémolytique pour cette même espèce d'hématies. Voilà donc deux alexines diverses, celles des sérums neufs de lapin et de cobaye, qui toutes deux peuvent détruire les globules de lapin sensibilisés. Les alexines d'autres animaux se comporteront-elles de même? En d'autres termes, la présence de la sensibilisatrice augmentera-t-elle considérablement la faculté destructive de divers sérums neufs?

L'expérience qu'on fait pour répondre à cette question montre que les globules (de lapin) sensibilisés (c'est-à-dire additionnés d'hémotoxine qui a été chauffée à 55°) se dissolvent rapidement dans les sérums neufs de rat, de chèvre, de chien, sérums qui pourtant ne sont par eux-mêmes (sans le concours de la sensibilisatrice) que faiblement globulicides. La présence de la sensibilisatrice accroît donc beaucoup le pouvoir hémolytique de ces divers sérums. Elle accroît aussi, mais moins nettement, l'activité du sérum neuf de pigeon. Quant aux sérums neufs de poule et d'oie, ils sont déjà, par eux-mêmes, très hémolytiques pour les globules de lapin, et l'addition de sensibilisatrice ne paraît pas accentuer beaucoup leurs propriétés.

Notons que parmi tous ces sérums neufs, c'est encore le sérum de cobaye qui détruit le plus activement les globules impressionnés par la sensibilisatrice que nous employons; il est sous ce rapport visiblement supérieur au sérum de rat, plus encore au sérum de lapin; pour que ce dernier détruise très rapidement les globules sensibilisés, il faut l'employer à doses un peu plus fortes, surtout quand les globules en jeu ne sont impressionnés que par une dose assez faible de sensibilisatrice

1. Rappelons une fois pour toutes que, lorsque nous disons « sensibilisatrice », nous entendons toujours désigner le sérum hémolytique qui a été chauffé à 55°, et qui, privé d'alexine, ne contient plus que la sensibilisatrice ou anticorps spécifique.

2. Si l'énergie de la substance sensibilisatrice est un peu diminuée, il peut arriver que des doses faibles de sérum de lapin ne dissolvent plus bien les hématies, alors que, dans les mêmes conditions, des doses faibles de sérum neuf de cobaye se montrent encore actives.

Un fait analogue à ceux que nous venons de mentionner a été constaté récemment par M. Buchner[1]. D'après ce savant, des globules rouges de bœuf, mis en contact avec une sensibilisatrice appropriée (fournie par le lapin injecté préalablement de sang de bœuf) se détruisent très bien dans le sérum neuf de chien. Au point de vue général, ces notions étaient du reste établies depuis longtemps. En effet, dans un ordre d'idées analogue, nous avons fait voir il y a cinq ans que les vibrions cholériques additionnés d'un peu de sensibilisatrice anticholérique (c'est-à-dire du sérum, préalablement chauffé à 55°, d'une chèvre solidement immunisée contre le vibrion) se transforment *in vitro* en granulations arrondies lorsqu'on les met en contact avec du sérum neuf de cobaye, de lapin, de rat, d'homme, de chèvre. Nous avons pu, plus récemment, ajouter encore à cette liste les sérums de chien, de poule, de pigeon[2]. Les vibrions sensibilisés sont dont atteints par les alexines qui se rencontrent dans de nombreux sérums neufs. Il en est de même pour ce qui concerne les globules.

Pour que ces notions soient complètes, nous devons forcément revenir sur une remarque que nous avons déjà publiée antérieurement. Nous avons, en effet, fourni il y a un an[3] le premier exemple de ce fait, que des globules sensibilisés ne se dissolvent pas indistinctement dans tous les sérums neufs, en d'autres termes dans toutes les alexines. Par exemple, les globules de *poule* sensibilisés (par un sérum hémolytique, chauffé à 55°, provenant de lapins traités par le sang de poule) se dissolvent bien dans divers sérums neufs, mais restent entièrement intacts dans le sérum neuf ou alexine de *poule*. Il y a là une certaine contradiction avec le fait que des globules de *lapin* sensibilisés se détruisent facilement dans l'alexine ou sérum neuf de *lapin*. En signalant l'année dernière cette contradiction, nous disions qu'on pourrait rapprocher (comparaison déjà invoquée par Fischer à propos des diastases) la modification apportée par la sensibilisatrice sur le globule, de celle qui consisterait à changer la structure d'une serrure, de façon à y permettre l'introduction facile d'une ou de plusieurs clefs

1. Buchner, *Munchener med. Wochenschr.*, 1900.
2. Bordet, ces *Annales*, 1899, page 291.
3. Ces *Annales*, avril, 1899, p. 282 et 283.

qui n'y entraient pas auparavant. De même, dans un globule sensibilisé, certaines alexines « entreront », et détruiront le globule; d'autres, un peu dissemblables, se refuseront à l'attaquer. Il doit donc exister, pour que la destruction des globules s'opère, certains rapports convenables entre la nature de la sensibilisatrice et celle de l'alexine en jeu. Nous n'insistons plus sur ces considérations qui nous sont du reste empruntées par M. Wassermann dans un travail qui vient de paraître [1].



2° *Identité, dans un même sérum, de l'alexine bactériolytique et de l'alexine hémolytique.* — En présence de la sensibilisatrice anticholérique, un sérum neuf, tel que le sérum de cobaye, attaque énergiquement les vibrions et les transforme en granules. D'autre part, en présence de la sensibilisatrice d'un sérum hémolytique, ce même sérum neuf détruit les globules rouges. Si le sérum neuf a été lui-même chauffé à 55°, il ne provoque plus, même lorsqu'on l'associe aux sensibilisatrices, aucune action soit bactériolytique, soit hémolytique. On exprime ce fait en disant que le chauffage à 55° détruit dans le sérum la ou les alexines qui provoquent la cytolyse [2]. On peut se demander si ce sérum neuf de cobaye ne contient qu'une seule alexine, à la fois hémo et bactériolytique, ou s'il en renferme plusieurs, l'une (ou les unes) apte à détruire certains microbes, l'autre (ou les autres) attaquant de préférence les hématies. Cette question peut être résolue expérimentalement.

Lorsque nous mélangeons à du sérum neuf de cobaye des vibrions cholériques normaux, les vibrions ne sont pas détruits ou ne sont atteints qu'en petit nombre ; comme ils ne sont pas sensibilisés, l'alexine n'entre guère en réaction avec eux et les respecte [3]. Si dans un pareil mélange nous introduisons ultérieurement des globules sensibilisés (c'est-à-dire des hématies de lapin additionnées de notre hémotoxine préalablement

1. Wassermann, *Deutsche med. Wochenschrift*, 1900.

2. On sait que non seulement le sérum de cobaye, mais aussi les sérums des autres animaux perdent à 55° leurs propriétés cytolytiques (lapin, rat, chèvre, poule, etc.).

3. Comme nous l'avons indiqué il y a longtemps (Ces *Annales*, 1895, p. 491) le sérum neuf mis en contact avec les vibrions n'en transforme en granules qu'un petit nombre, à moins que ceux-ci ne soient très atténués.

chauffée à 55°), nous constatons que ces globules se détruisent avec rapidité. Ceci prouve que les vibrions cholériques normaux n'ont ni transformé ni fixé l'alexine nécessaire à la destruction des globules.

Répétons cette expérience en y apportant une modification. Ajoutons à du sérum de cobaye neuf, en même dose que précédemment, des vibrions cholériques non pas normaux, mais additionnés d'un peu de cholérasérum préalablement chauffé à 55°, impressionnés, en d'autres termes, par la cholérasensibilisatrice. Dans de telles conditions, mêlés au sérum neuf, les vibrions sensibilisés subissent rapidement la transformation granuleuse. Ajoutons ensuite au mélange, comme nous le faisions dans le premier essai, des globules sensibilisés. Nous constatons cette fois que ces globules restent indéfiniment intacts. En conséquence, nous pouvons conclure que l'alexine nécessaire à la destruction des globules a été consommée avant l'introduction de ceux-ci. Sous l'influence de la cholérasensibilisatrice, elle est entrée en réaction avec les vibrions, les a transformés en granules en se fixant sur eux. Donc, *l'alexine qui se fixe sur les vibrions sensibilisés, et les altère, est identique à celle qui produit l'hémolyse.*

Exp. L'émulsion de vibrions employée est préparée en délayant une culture sur gélose, âgée de 24 heures, dans 5 c. c. d'eau physiologique (0,65 0/0 de NaCl). La cholérasensibilisatrice est du sérum de *lapin* très vacciné, sérum chauffé au préalable à 55°. A ce sérum actif, on donne comme témoin inactif du sérum neuf de *lapin*, également chauffé à 55°.

a) Mélange de : 0,5 c. c. de sérum neuf de cobaye, 0,3 c. c. de cholérasensibilisatrice (de lapin), 0,5 c. c. d'émulsion de vibrions;

b) Mélange de : 0,5 c. c. de sérum neuf de cobaye, 0,3 c. c. de sérum neuf (de lapin) préalablement chauffé à 55° ; 0,5 c. c. d'émulsion de vibrions.

c) Mélange identique à *a*), sauf qu'on n'y ajoute pas d'émulsion de vibrions.

On laisse en contact pendant une heure environ. On ajoute ensuite, à chaque mélange, 0,2 c. c. de hémosensibilisatrice (sérum hémolytique chauffé à 55°), additionnée de 2 gouttes de sang de lapin, sang lavé au préalable à l'eau physiologique [1].

1. Dans la plupart des expériences, nous employons non pas du sang défibriné ordinaire, mais du sang préalablement lavé. Ce lavage permet d'introduire les globules rouges dans les expériences, sans mettre en jeu le sérum qui fait partie du sang défibriné. On lave les globules en mélangeant une faible dose de sang défibriné à une grande quantité d'eau physiologique. On centrifuge et on décante le liquide surnageant.

Résultats : les globules se détruisent avec la même rapidité dans *b*) et *c*) ; ils restent intacts dans *a*).

On peut arriver à la même conclusion par une expérience fort semblable, mais où les deux éléments figurés (microbes et globules) interviennent dans l'ordre inverse. On sait, par les recherches de MM. Ehrlich et Morgenroth et les nôtres, qu'une alexine incapable de détruire des globules rouges d'une certaine espèce ne se fixe pas sur ces hématies ; au contraire, elle est absorbée par les globules qu'elle peut dissoudre.

D'autre part, une alexine, qui dans les circonstances normales respecte des globules rouges déterminés et ne s'y unit pas, se fixe au contraire sur ces mêmes hématies, lorsque celles-ci ont été sensibilisées à l'influence alexique, grâce à l'intervention d'une sensibilisatrice appropriée. C'est là le fait de la fixation de l'alexine par les globules sous l'action de la sensibilisatrice, fait important dont MM. Ehrlich et Morgenroth ont les premiers publié la démonstration expérimentale [1], et qui apparaît comme une remarquable confirmation de cette notion établie par nous depuis plusieurs années [2], à savoir que c'est par l'intermédiaire d'une sensibilisatrice appropriée (matière préventive) que l'organisme dirige son pouvoir bactéricide (ou cellulicide), spécialement sur tel ou tel élément figuré.

Mélangés au sérum frais de cobaye neuf, les globules de lapin normaux restent intacts, l'alexine n'est donc pas absorbée. Si l'on ajoute ultérieurement à ce mélange des vibrions sensibilisés (par du choléraséram qui a été chauffé à 55°), ceux-ci présentent bientôt le phénomène de la transformation granuleuse. Ceci prouve que le liquide contenait bien réellement de l'alexine en liberté. Mais si, dans une seconde expérience, nous mêlons avec du sérum de cobaye neuf des globules de lapin impressionnés par l'hémosenbilisatrice, ces globules se détruisent en absorbant l'alexine. On observe alors que les vibrions sensibilisés qu'on peut introduire ultérieurement dans le liquide, y gardent leur aspect normal et ne se détruisent pas.

Exp. On emploie une émulsion de vibrions cholériques (préparée en délayant une culture sur gélose dans 10 c. c. d'eau physiologique), additionnée

1. Ehrlich et Morgenroth, *Berliner Klin. Wochenschr.*, 1899, n° 1.
2. Ces *Annales*, 1895, et *Annales de la Société des Sc. nat. et méd. de Bruxelles*, 1895.

d'un tiers environ de cholérasérum (de lapin) chauffé au préalable pendant 1/2 heure, à 55°,5. C'est une émulsion de vibrions sensibilisés. — Le sang qu'on emploie est du sang de lapin lavé à l'eau physiologique.

a) Mélange de : 0,3 c. c. sang de lapin; 0,6 c. c. de sérum hémolytique chauffé au préalable à 55° (hémosensibilisatrice); 0,3 c. c. de sérum frais de cobaye neuf. — Il se produit une hémolyse complète et rapide.

b) Mélange identique à *a*), sauf que l'hémosensibilisatrice est remplacée par 0,6 c. c. de sérum de cobaye neuf, chauffé au préalable à 55°. — Il ne se fait aucune hémolyse.

c) Mélange identique à *a*), sauf qu'au lieu de sang de lapin, on introduit du sang de cobaye (0,3 c. c.). Dans ce mélange, il ne se produit aucune hémolyse, car les hématies de cobaye ne sont nullement attaquées par le mélange de sérum frais de cobaye et de sérum hémolytique chauffé.

Au bout de 1 à 2 heures, on introduit dans les divers mélanges 0,1 c. c. de l'émulsion de vibrions sensibilisés.

Les mélanges séjournent ensuite à l'étuve à 37° pendant une heure.

Résultats : Dans le mélange *a*) où l'hémolyse s'est effectuée, les vibrions ne subissent aucune transformation. La métamorphose des vibrions en granules est complète au contraire dans les mélanges *b*) et *c*) où les globules sont restés intacts.

*
* *

3° *Fixation, par les globules, des substances actives du sérum hémolytique. Rôle des stromas.* — Des globules de lapin, mis en contact avec notre sérum hémolytique chauffé au préalable à 55°, restent intacts (sauf qu'ils présentent, comme on sait, le phénomène de l'agglutination). Ils fixent dans ces conditions la substance sensibilisatrice[1]. Ces mêmes globules, soumis à l'action soit du sérum hémolytique frais, soit d'un mélange de sérum neuf frais et de sérum hémolytique préalablement chauffé à 55°, se détruisent. Ils fixent alors, comme on peut s'en assurer facilement, à la fois la sensibilisatrice et l'alexine.

Il convient de se demander quelle est la partie du globule qui absorbe ainsi les matières actives. Des globules plongés dans l'eau distillée perdent, on le sait, leur hémoglobine, et se réduisent à des stromas transparents et très délicats qui nagent dans le liquide fortement rougi. On peut rechercher si la fixation des matières hémotoxiques est opérée par les substances dissoutes dans la liqueur rouge, ou bien s'il faut l'attribuer aux stromas en suspension. Il est utile, pour résoudre cette question de pouvoir séparer facilement les stromas du liquide où ils baignent. On y arrive aisément.

1. Comme nous l'avons indiqué antérieurement, ils fixent aussi l'agglutinine.

Prenons 3 c. c. de sang défibriné de lapin, de préférence lavé au préalable à l'eau physiologique. Ajoutons, à ces 3 c. c. de sang, 15 c. c. d'eau distillée; nous obtenons un liquide très rouge et à peu près transparent. Au microscope, on distingue les stromas à peine visibles, très translucides, régulièrement arrondis et qui semblent s'être gorgés d'eau.

D'autre part, prenons 1 c. c. d'eau physiologique, auquel nous ajoutons 0,0975 gramme de chlorure de sodium; versons ensuite dans notre liquide rouge ce centimètre cube de solution saline assez concentrée. Cette addition a pour effet de donner au liquide rouge une teneur en sel égale à celle de l'eau physiologique (0gr,65 0/0). Nous constatons que l'addition de l'eau salée a pour effet de troubler immédiatement le liquide rouge, d'abord presque transparent. Le trouble s'agglomère bientôt en flocons blanchâtres qui peu à peu se déposent au fond du tube, tandis que la partie supérieure du liquide devient absolument limpide. L'examen au microscope montre que les flocons sont constitués par les stromas fortement agglutinés. Ces stromas ont beaucoup changé d'aspect. De transparents et régulièrement arrondis qu'ils étaient, ils sont devenus beaucoup plus visibles, et en même temps se sont fortement aplatis en disques minces, un peu incurvés, qui fréquemment se montrent par la tranche. Ils paraissent avoir subi une véritable plasmolyse. Les choses se passent donc comme si les stromas étaient de véritables membranes d'enveloppe des globules, de véritables sacs clos susceptibles d'entrer en turgescence dans les liquides pauvres en sels, de se rétracter ensuite et de s'aplatir sous l'influence de la concentration.

Quoi qu'il en soit, on peut aisément, surtout en hâtant par la centrifugation le dépôt des stromas, scinder le liquide en deux parties, l'une absolument limpide, ne contenant aucun élément visible au microscope; l'autre, rouge aussi, mais très trouble, renfermant en suspension une forte quantité de stromas [1]. Dès lors, à des doses égales de ces deux liquides, on peut ajouter des quantités semblables de sensibilisatrice, ou sérum hémolytique chauffé à 55°, et d'alexine (sérum de cobaye neuf). Il faut introduire une dose convenable, pas trop forte, de cette

1. On s'assure, bien entendu, qu'il n'existe plus, parmi les stromas, de globules encore intacts.

dernière. On agite, et au bout d'un certain temps on ajoute aux deux liquides des globules de lapin fortement sensibilisés par l'hémotoxine (chauffée à 55°). On constate que ces globules ne se dissolvent pas ou se dissolvent très lentement dans le liquide qui contient les stromas, se détruisent au contraire très rapidement dans le liquide rouge limpide. On peut conclure de cette expérience *qu'il convient d'attribuer aux stromas la propriété que possèdent les globules rouges d'absorber l'alexine en présence de sensibilisatrice.*

Dans une seconde expérience, on peut cette fois mettre les deux liquides rouges (le premier qui est dépourvu de stromas, le second qui en contient) en contact avec une dose convenable de sensibilisatrice (sérum hémolytique chauffé à 55°). On agite; après un certain temps, on centrifuge le second mélange pour pouvoir séparer les stromas, et l'on décante le liquide limpide surnageant. On constate aisément que celui-ci ne contient plus de sensibilisatrice; en effet, il ne s'y produit pas d'hémolyse lorsqu'on l'additionne de globules rouges et de sérum neuf de cobaye. Le premier liquide, au contraire, celui qui ne contenait pas de stromas, a gardé sa sensibilisatrice sous forme active. *La propriété d'absorber la sensibilisatrice appartient donc aux stromas.*

Enfin, dans une troisième expérience, on peut démontrer que les stromas absorbent l'alexine en présence de sensibilisatrice, tandis qu'ils ne la fixent pas lorsque cette dernière substance est absente. Pour faire cette expérience, on se procure une émulsion épaisse de stromas, à laquelle on ajoute un grand volume d'eau physiologique. On centrifuge, on décante le liquide surnageant qui est limpide et légèrement rose. On répète ce lavage par l'eau physiologique jusqu'à ce que l'émulsion de stromas soit tout à fait blanche, débarrassée d'hémoglobine. On divise cette émulsion en deux parts égales, on ajoute à chacune la même dose d'alexine (sérum de cobaye neuf). Dans le premier mélange on introduit ensuite un peu de sensibilisatrice (sérum hémolytique chauffé à 55°); dans le second, même dose de sérum de cobaye neuf qui a été également chauffé à 55°. On constate ultérieurement, par les procédés habituels, que dans le premier mélange l'alexine a disparu du liquide pour se fixer sur les stromas; ce phénomène d'absorption de l'alexine ne s'est

pas produit dans le second mélange, qui ne contenait pas de sensibilisatrice.

En résumé, c'est à leurs stromas que les globules rouges doivent leurs propriétés absorbantes caractéristiques. Devons-nous attribuer également aux stromas la propriété qu'ont les globules rouges de lapin de provoquer, lorsqu'on les injecte à un cobaye, la sécrétion dans cet organisme d'un anticorps actif, de faire apparaître chez ce cobaye le pouvoir hémolytique du sérum? Pour répondre à cette question, on se procure des stromas qu'un lavage soigné à l'eau physiologique a débarrassés des matières solubles dont ils étaient imbibés, et l'on injecte à des cobayes ces stromas blanchâtres. Chaque cobaye reçoit la dose de stromas que fournissent 4-5 c. c. de sang défibriné. A d'autres cobayes, on injecte un peu de liquide très rouge, limpide, chargé d'éléments globuliens solubles, et qui provient des globules traités par l'eau distillée, avec addition consécutive de sel marin. On a eu soin de centrifuger ce liquide (comme il a été dit a propos des expériences précédentes), pour le priver des stromas en suspension. Trois semaines après les injections, on trouve que les *cobayes injectés de stromas fournissent un sérum hémolytique actif*: ceux qui ont reçu le liquide limpide riche en hémoglobine donnent un sérum fort semblable à celui de cobayes neufs.

*
* *

Les globules fixent les substances actives du sérum hémolytique. Peut-on préciser la nature de ce phénomène de fixation? S'agit-il là d'une véritable combinaison chimique, unissant aux principes actifs certains éléments des hématies, et se conformant aux lois des proportions définies? Devons-nous admettre, au contraire, que la fixation opérée par les globules se rapproche plutôt des phénomènes de teinture? Lorsqu'un corps colorable se teint, il absorbe, on le sait, des quantités de matière colorante qui peuvent être extrêmement variables; il peut acquérir de la sorte soit des teintes pâles, soit des tons foncés, soit des nuances intermédiaires. La dose de couleur fixée peut subir des variations fort étendues, tandis que le caractère dominant des réactions chimiques proprement dites est de s'effectuer suivant des proportions nettement définies.

Nous ne pouvons traiter ici ce problème délicat, attendu que

nous n'avons pas jusqu'ici de renseignements expérimentaux suffisants. Nous nous bornerons à relater une seule expérience, dont il faudra tenir compte lorsqu'on étudiera ces questions d'une manière plus approfondie.

Si nous versons dans une certaine quantité de sérum hémolytique frais (0,4 c. c. par exemple) une petite dose de sang défibriné de lapin (0,1 c. c. par exemple), nous observons que les globules se détruisent très rapidement. Cette hémolyse est encore assez rapide, mais cependant plus lente, si nous ajoutons au sérum une dose de sang plus considérable (0,3 ou 0,4 c. c. par exemple). La destruction des globules est, chose assez naturelle, d'autant plus rapide que la quantité de sang mis en présence de l'hémotoxine est plus faible. Néanmoins le sérum que nous employons est capable de détruire complètement et assez vite un volume égal ou même un volume légèrement supérieur de sang de lapin. Par exemple, si dans 0,4 c. c. de sérum nous introduisons 0,5 c. c. de sang, les globules sont tous détruits au bout d'une heure environ.

Dans cette expérience, nous supposons que la dose de sang employée (0,5 c. c.) a été versée en une fois dans les 0,4 c. c. de sérum. Mais nous pouvons aussi introduire le sang dans le sérum d'une manière fractionnée ; verser par exemple dans ces 0,4 c. c. d'hémotoxine une première dose de 0,2 de sang, une seconde dose de 0,1 c. c. au bout d'une heure ou deux, une troisième dose après un nouvel intervalle. Bref, nous pouvons rechercher si une quantité déterminée de sérum est capable de détruire toujours le même nombre de globules, soit que ceux-ci aient été mélangés brusquement, en une seule fois, soit qu'ils aient été additionnés à l'hémotoxine d'une manière discontinue ou fractionnée. Or, on trouve que le sérum est rapidement épuisé dans sa fonction dissolvante, lorsque le sang est introduit peu à peu par petites doses, surtout lorsque les intervalles de temps qu'on ménage entre les diverses additions sont prolongés. On constate, en effet, qu'une dose de 0,4 c. c. de sérum hémolytique frais — dose capable de détruire complètement au moins 0,5 c. c. de sang lorsque celui-ci est mélangé en une seule fois au sérum — ne dissout pas plus que 0,2 c. c. de sang, lorsque les globules sont ajoutés peu à peu au sérum, avec des intervalles. Les premières doses qu'on introduit se

dissolvent bien, jusqu'à ce que la quantité de sang versée est égale à 0,2 c. c. environ, mais les globules introduits ultérieurement restent intacts. Lorsque le sang est mélangé brusquement au sérum, celui-ci dissout donc au moins deux fois plus de globules qu'il n'en détruit dans le cas où l'on introduit ceux-ci par petites doses successives. Il faut admettre que, dans ce dernier cas, les premiers globules introduits se sursaturent en quelque sorte de matière active, épuisent le liquide, qui bientôt devient inactif à l'égard de nouvelles hématies. Ces premiers globules absorbent donc plus de substance active qu'il ne leur en fallait pour qu'ils pussent se dissoudre.

Ce fait nous paraît plaider en faveur de l'idée que l'absorption des principes actifs par le globule doit être comparée aux phénomènes de teinture; dans ceux-ci, en effet, les éléments colorables peuvent absorber des quantités très variables de couleur, et se prêtent à des expériences tout à fait similaires à celle qui concerne les globules et que nous venons de relater.

Si nous versons dans un cristallisoir 10 c. c. d'une solution diluée, assez pâle, de violet de méthyle, et si nous plongeons dans ce liquide une feuille de papier filtré, celle-ci se colore. Bientôt elle acquiert une teinte d'une intensité assez faible, identique dans tous ses points, tandis que le liquide, de plus en plus épuisé, se décolore. Prenons maintenant une même dose du même liquide colorant et une feuille de papier semblable et de mêmes dimensions. Au lieu de plonger tout d'un coup cette feuille entière dans le liquide, découpons-la en morceaux. Immergeons le premier fragment; celui-ci prendra une teinte remarquablement foncée et appauvrira notablement le bain colorant.

Immergeons ensuite un second fragment, puis, au bout d'un nouvel intervalle, un troisième. En raison de la décoloration partielle du bain, ceux-ci ne prendront déjà plus qu'une teinte pâle. Bientôt le liquide sera entièrement décoloré, et les fragments immergés en dernier lieu resteront blancs. On peut admettre, par comparaison, que les premiers globules introduits dans l'hémotoxine sont déjà susceptibles de perdre leur hémoglobine lorsqu'ils ne sont encore que « faiblement teints » par les principes actifs, mais qu'ultérieurement ils peuvent absorber une dose beaucoup plus grande de ces substances, épuiser ainsi

le sérum et empêcher la destruction de nouveaux globules introduits dans la suite.

Il est difficile de savoir par quel mécanisme l'alexine détruit les hématies sensibilisées et en fait sortir l'hémoglobine. Citons un fait qui pourra peut-être faciliter les recherches qu'on entreprendra pour élucider ce point délicat. Ajoutons à du sang défibriné de lapin une dose assez faible d'hémotoxine. Attendons que l'hémolyse soit complète. D'autre part, ajoutons à une même dose de sang une quantité correspondante de sérum de cobaye neuf; dans ce second mélange les globules resteront intacts. Étendons les deux mélanges d'une forte quantité d'eau distillée; bientôt les globules du second mélange seront également détruits. Nous avons donc deux liquides: dans le premier, les globules ont été détruits par le sérum actif; dans le second, par l'eau distillée. Ajoutons à ces deux liquides une dose assez forte de sel marin. Nous constatons que dans celui où les globules ont été dissous, non pas par le sérum, mais par l'eau distillée, les stromas se plasmolysent énergiquement et se rétractent (voir plus haut). Dans l'autre liquide (contenant l'hémotoxine), les stromas gardent sans changement leur forme primitive, régulièrement arrondie; ils ne paraissent plus ressentir l'influence de la concentration. Il semble donc que l'alexine du sérum actif a détruit, digéré, dans le globule. « quelque chose » qui commande les actions de plasmolyse, les phénomènes d'osmose. De cette destruction résulterait la diffusion de l'hémoglobine soluble.

§ II. — Antitoxine du sérum hémolytique.

On obtient facilement un sérum doué de propriétés antitoxiques vis-à-vis de l'hémotoxine dont il a été question dans les pages précédentes, capable en d'autres termes de protéger les globules de lapin contre le pouvoir destructif de ce sérum hémolytique[1]. Ce dernier est toxique pour le lapin. Injecté à doses assez fortes (5 c. c. environ) dans les veines de cet animal,

1. Nous avons fait voir (Ces *Annales*, avril 1899) qu'on peut obtenir une antitoxine (antihémolytique) comparable à celle que MM. Camus et Gley, Kossel ont préparée et qui neutralise le sérum d'anguille. Le sérum que nous avons décrit s'opposait à l'action hémolytique du sérum de poule.

Récemment (Ces *Annales*, 1900, n°1) M. Metchnikoff a décrit une « antispermotoxine ».

il tue presque instantanément. On trouve à l'autopsie, dans le cœur et les gros vaisseaux, des caillots baignant dans un sérum coloré en rouge. Dans ces conditions l'hémolyse s'effectue *in vivo*. On trouve des suffusions hémorrhagiques disséminées, fréquentes dans le rein, les muscles, particulièrement le muscle psoas. Injectée sous la peau des lapins, à dose faible, l'hémotoxine ne produit pas de désordres graves, mais les animaux traités de la sorte acquièrent le pouvoir antitoxique du sérum.

Il suffit d'injecter l'hémotoxine à deux ou trois reprises, à 15 jours d'intervalle, à la dose de 2-3 c. c. On saigne les lapins 12 à 15 jours après la dernière injection.

Le sérum antitoxique (antihémolytique, antihémotoxique) qu'on obtient après ce traitement peu prolongé n'est pas, à la vérité, doué d'une très grande puissance ; il est cependant assez actif pour qu'on puisse commodément en étudier les propriétés.

Pour mettre en évidence le pouvoir antitoxique, on commence par l'expérience la plus simple, qui consiste à ajouter, à une petite quantité de sérum hémolytique bien frais, une dose assez forte d'antitoxine récemment extraite. On additionne ensuite le mélange d'une petite quantité de sang de lapin. Comme expérience de contrôle, on fait en même temps, suivant des proportions identiques, un mélange de sérum hémolytique, de sérum de lapin neuf et de sang de lapin.

On constate, si la dose d'antitoxine est suffisante, que la dissolution des globules ne se produit pas dans le premier mélange. Dans le second, au contraire, qui contient, au lieu de sérum antitoxique, une dose correspondante de sérum de lapin neuf, la destruction des hématies s'effectue.

Pour protéger efficacement les globules dans une telle expérience, il faut mettre en jeu une dose d'antitoxine très notablement (10 à 20 fois) supérieure à celle du sérum hémolytique qu'elle doit neutraliser. Nous rappelons qu'on emploie pour ces expériences une hémotoxine fort active, fournie par des cobayes qui ont été soumis à 3 injections de 4-5 c. c. de sang de lapin.

Disons immédiatement que le sérum antitoxique est en réalité plus actif qu'il ne paraît l'être dans cette expérience préliminaire : il est possible, par un moyen très simple, de lui faire neutraliser efficacement des quantités beaucoup plus grandes de sérum hémolytique. Il suffit pour cela de le chauffer à 55°. Après

ce traitement, 3 volumes (souvent même 2 volumes) de sérum antitoxique neutralisent complètement l'activité d'un volume de sérum hémolytique frais.

Nous rencontrerons plus loin l'explication de ce phénomène, dont nous pouvons d'ailleurs deviner facilement la raison d'être. Le sérum antitoxique contient, lorsqu'il est frais, de l'alexine de lapin, qui en présence de la substance sensibilisatrice propre à l'hémotoxine, devient dangereuse pour le globule de lapin. A côté de son pouvoir antitoxique, le sérum contient donc un élément (alexine) qui, s'il n'est pas toxique par lui-même, peut au moins le devenir. Pour que le sérum manifeste le mieux possible son activité protectrice, il y a donc intérêt, on le conçoit aisément, à éliminer par le chauffage à 55° cet élément gênant.

Que notre sérum antitoxique possède — comme le sérum de lapin neuf — une alexine capable de détruire les hématies en présence d'un excès de matière sensibilisatrice, ce fait (déjà presque certain *à priori*, puisque l'antitoxine est du sérum de lapin) se démontre aisément. On mélange du sérum hémolytique, chauffé au préalable à 55°, avec de l'antitoxine fraîche en quantité pas trop forte (parties égales par exemple), et l'on ajoute un peu de sang de lapin.

Les globules se dissolvent : cette destruction est due à l'alexine de l'antitoxine, le sérum hémolytique chauffé n'étant pas susceptible de produire par lui-même l'hémolyse. Si nous avions additionné la sensibilisatrice d'une grande dose d'antitoxine, l'hémolyse ne se serait pas effectuée. En effet, comme nous allons le voir, la sensibilisatrice eût été neutralisée, et dans ces conditions l'alexine de l'antitoxine n'eût exercé sur les globules aucune influence nuisible. Dans de telles conditions, en présence de sensibilisatrice, une faible dose d'antitoxine détruit donc les globules, une grande dose les respecte.

En résumé, il y a intérêt, pour étudier les propriétés de l'antitoxine, de chauffer au préalable cette dernière à 55°. C'est ce que nous ferons généralement.

*
* *

Antisensibilisatrice, anti-alexine. — Nous savons que le sérum hémolytique détruit les globules de lapin grâce à l'action sur ces éléments de deux substances bien distinctes : la sensibilisatrice

spécifique (anticorps, matière préventive) et l'alexine. Cette dernière substance, que l'on trouve aussi dans le sérum neuf, attaque avec beaucoup d'énergie les globules de lapin que notre sensibilisatrice appropriée a impressionnés.

Dès lors, puisque le sérum hémolytique possède deux substances actives qui toutes deux doivent intervenir pour que l'action hémotoxique se manifeste, on doit remarquer immédiatement que l'antitoxine pourrait protéger efficacement les globules, tout en ne neutralisant qu'une seule des deux matières dont le concours est nécessaire à l'hémolyse. Quelle est, de ces deux substances, celle que l'antitoxine neutralise?

Ou bien, les atteint-elle toutes deux simultanément?

Nous décrivons dans les lignes qui suivent les expériences grâce auxquelles on peut répondre à cette question; nous en énonçons immédiatement la conclusion, à savoir que *le sérum antitoxique neutralise à la fois, d'une part la substance sensibilisatrice, d'autre part l'alexine du sérum hémolytique* que fournissent les cobayes traités par le sang défibriné de lapin.

Pour mettre en évidence l'action neutralisante que l'antitoxine exerce sur la matière sensibilisatrice, on met à profit ce fait que les globules de lapin, impressionnés par la sensibilisatrice (c'est-à-dire par le sérum hémolytique préalablement chauffé à 55°), se détruisent non seulement dans le sérum neuf de cobaye, mais aussi dans le sérum neuf ou alexine de lapin. Or, le sérum de lapin neuf est d'autre part absolument inoffensif pour les globules de lapin qui n'ont pas été sensibilisés. Le sérum frais de lapin neuf est donc un réactif excellent qui permet de dénoter la présence, dans un sérum où baignent les globules, de la matière sensibilisatrice. D'un autre côté, il faut admettre (et ce point se démontre du reste facilement par une expérience appropriée) que notre antitoxine, provenant du lapin, est tout à fait incapable de neutraliser l'alexine du sérum de lapin. Par conséquent, si dans un mélange formé (en proportions convenables) de : sérum hémolytique chauffé au préalable à 55°, sérum antitoxique qui a été chauffé de même, sérum frais de lapin neuf, des globules introduits ultérieurement restent intacts, on pourra conclure que la sensibilisatrice du sérum hémolytique chauffé à 55° a été neutralisée par l'antitoxine. On fait, bien entendu, un mélange de contrôle, cons

titué par des doses semblables des mêmes éléments, sauf qu'on remplace le sérum antitoxique par du sérum de lapin neuf préalablement chauffé à 55°. Dans ce dernier mélange, la destruction des globules impressionnés par la sensibilisatrice demeurée active s'effectue sous l'influence de l'alexine du sérum frais de lapin neuf.

On constate, par de telles expériences, que la fonction anti-sensibilisatrice de notre antitoxine est peu développée : il faut en effet en moyenne quinze parties d'antitoxine pour neutraliser la sensibilisatrice contenue dans une partie de sérum hémolytique qui a été chauffé à 55°. Bien plus remarquable est l'intensité de la fonction anti-alexique de l'antitoxine.

Pour mettre en relief le pouvoir anti-alexique, il suffit de préparer un mélange d'antitoxine (chauffée à 55°) et d'une dose assez forte de sérum hémolytique frais. On mêle par exemple 2 parties d'antitoxine à 1 partie d'hémotoxine; on ajoute des globules de lapin. On constate que ceux-ci restent intacts, même après un temps prolongé. Mais si l'on additionne ce mélange d'une petite quantité de sérum frais de lapin neuf, qui cependant est par lui-même complètement inoffensif pour les hématies, on trouve que la dissolution, nulle jusqu'à ce moment, s'opère désormais avec rapidité. Ceci nous montre que le mélange primitif contenait un excès de matière sensibilisatrice, dont le sérum de lapin neuf a révélé la présence en détruisant les globules. Par conséquent, si le mélange primitif respectait les globules, ce n'était point faute de sensibilisatrice, c'était grâce à la neutralisation, par l'antitoxine, de l'alexine de cobaye que contenait le sérum hémolytique frais.

On peut aussi, pour mettre en évidence l'action anti-alexique, préparer un mélange de 1 c. c. de sérum frais de cobaye neuf et de 2 ou 3 c. c. d'antitoxine (préalablement chauffée à 55°). D'autre part, on ajoute à 1 c. c. de sérum frais de cobaye, 2 ou 3 c. c. de sérum de lapin neuf (également chauffé à 55°). Ce second mélange sert de témoin. On introduit ensuite dans chaque mélange une dose de sensibilisatrice (sérum hémolytique chauffé à 55°) assez forte pour n'être pas neutralisée par l'antitoxine. Des globules de lapin, mêlés ensuite à chacun des 2 mélanges, se conservent dans le premier et se détruisent dans le second. Pour que cette expérience soit décisive, il est bon d'avoir un troisième

mélange, contenant, comme le premier, de l'antitoxine et de la sensibilisatrice en doses correspondantes, mais où le sérum neuf de cobaye est remplacé par une quantité égale de sérum de lapin neuf. Les globules se détruisent dans ce mélange, ce qui prouve tout d'abord que la dose de sensibilisatrice dont on a fait usage en préparant les divers mélanges dépasse celle que l'antitoxine peut annihiler ; ensuite, que notre antitoxine, active vis-à-vis de l'alexine de cobaye, ne neutralise nullement l'alexine du sérum de lapin.

La notion que l'antitoxine n'a qu'une puissance « antisensibilisatrice » faible, tandis que son « pouvoir anti-alexique » est notablement plus marqué, explique clairement le fait, signalé plus haut, que l'antitoxine préalablement soumise à un chauffage à 55° combat mieux l'influence du sérum hémolytique frais, que ne le fait l'antitoxine non chauffée. En effet, une dose moyenne d'antitoxine, ajoutée au sérum hémolytique frais, pourra bien neutraliser l'alexine de ce sérum hémolytique, mais laissera souvent à l'état actif une certaine dose de sensibilisatrice.

Or, si l'antitoxine n'a pas été chauffée, elle fournit elle-même une dose additionnelle d'alexine et concourt ainsi puissamment à la destruction des hématies, qu'elle n'a pu préserver de la sensibilisation. Après le chauffage à 55°, elle ne présente plus cet inconvénient; il lui suffit désormais, pour protéger les globules, de neutraliser l'une des substances actives, l'alexine du sérum hémolytique. Avant le chauffage, elle devait neutraliser complètement non seulement l'alexine, mais aussi la sensibilisatrice.

Il est extrêmement probable que *l'antisensibilisatrice* et *l'anti-alexine sont deux substances différentes*. En effet, une antitoxine préalablement sursaturée de sensibilisatrice a gardé intact son pouvoir de neutraliser l'alexine du sérum neuf de cobaye.

*
* *

Pouvoirs antihémolytique et antibactéricide de l'antitoxine. — Nous savons que si nous saignons trois cobayes, le premier qui est neuf et n'a subi aucune vaccination, le second qui a été traité par des injections de sang de lapin, le troisième qui a été immunisé contre le vibrion cholérique, nous obtenons trois

sérums qui tous possèdent la même alexine. Ce fait de l'identité de l'alexine du sérum neuf avec celle d'un immunsérum, est l'un des points essentiels de la théorie que nous avons émise il y a cinq ans pour expliquer le mode d'action des sérums préventifs contre les vibrions, — théorie sur laquelle nous revenons plus loin. — Parmi ces trois sérums, il en est deux qui sont des immunsérums et qui, s'ils sont identiques par l'alexine, diffèrent profondément en ce qui concerne leurs anticorps ou sensibilisatrices (matières préventives). Chaque immunsérum possède sa sensibilisatrice particulière et caractéristique, qui lui confère ses propriétés spéciales. D'autre part, l'identité des alexines qu'on trouve soit dans le sérum neuf, soit dans les immunsérums, nous explique, on le sait, pourquoi le même sérum neuf peut restituer indifféremment leurs propriétes destructives premières à divers immunsérums qu'un chauffage à 55° a privés de leur alexine. Or, si nous additionnons ce sérum de cobaye neuf, riche en alexine, d'une anti-alexine qui neutralise cette dernière substance, nous devons prévoir que ce sérum neuf deviendra incapable non seulement de dissoudre les globules rouges sensibilisés, mais aussi de transformer en granules les vibrions cholériques impressionnés par la choléra-sensibilisatrice, soumis en d'autres termes à l'action du choléra-sérum préalablement chauffé à 55°. Notre antitoxine neutralisant l'alexine de cobaye, il faut s'attendre à ce qu'elle protège des cellules très diverses (même respectivement sensibilisées par des anticorps appropriés) contre l'influence altérante de cette substance, et qu'elle sera, par exemple, à la fois antihémolytique et antibactéricide.

L'expérience confirme entièrement ces prévisions. Elle montre qu'en *mélangeant à de l'antitoxine* (préalablement chauffée à 55°) *une certaine dose de sérum frais de cobaye neuf, on enlève en même temps à ce dernier la propriété de restituer au sérum hémolytique chauffé à 55° son activité globulicide, et celle de rendre son pouvoir vibrionicide au choléraserum qui a été porté à cette même température de* 55°. Mais si, au lieu de mettre en jeu le *sérum de cobaye* neuf, nous faisons intervenir à sa place le *sérum de lapin* neuf, l'antitoxine ne manifeste plus aucune propriété protectrice, et ne préserve ni les vibrions ni les globules. Active, en effet, vis-à-vis de l'alexine de cobaye, elle ne neutralise nulle-

ment l'alexine de lapin. Voici le détail de cette expérience :

On emploie une émulsion de vibrions cholériques sensibilisés, préparée en délayant une culture sur gélose dans 10 c. c. d'eau physiologique; on ajoute au liquide 2 c. c. de cholérasérum (fourni par un lapin vacciné) chauffé au préalable à 56°-57°, et qui par conséquent ne transforme plus les vibrions en granules.

1° Mélanges à base de vibrions sensibilisés :

a) Mélange de : 0,2 c. c. sérum frais de cobaye neuf; 0,4 c. c. d'antitoxine (préalablement chauffée à 55°);

b) Mélange de : 0,2 c. c. sérum frais de cobaye neuf ; 0,4 c. c. de sérum de lapin neuf (préalablement chauffé à 55°) ;

c) Mélange de : 0,2 c. c. sérum frais de lapin neuf ; 0,4 c. c. d'antitoxine (chauffée à 55°);

d) Mélange de : 0,2 c. c. sérum frais de lapin neuf; 0,4 c. c. sérum de lapin neuf (chauffé à 55°).

A chacun de ces quatre mélanges, on ajoute ultérieurement 0,2 c. c. de l'émulsion de vibrions sensibilisés. Les mélanges séjournent ensuite une heure à 37°. On constate que la transformation en granules est complète dans les mélanges *b*), *c*), *d*). Les vibrions ont au contraire gardé leur forme normale dans le mélange *a*), dont l'alexine provient du cobaye et a été neutralisée par l'antitoxine;

2° Mélanges à base de sang sensibilisé. Ce dernier consiste en un mélange de 0,2 c. c. de sang de lapin (préalablement lavé à l'eau physiologique) avec 1 c. c. de sérum hémolytique qui a été chauffé 1/2 heure à 55°,5.

e) Mélange identique à *a*) ;

f) Mélange identique à *b*) ;

g) Mélange identique à *c*).

On ajoute à chacun de ces mélanges 0,1 c. c. de sang sensibilisé. Les globules se dissolvent très rapidement dans *f*), un peu moins rapidement dans *g*); ils restent intacts dans *e*).

Comme complément à cette expérience, disons que l'action bactéricide peut se constater non seulement par la transformation des vibrions en granules, mais même par la destruction complète de ces microbes qui, transplantés ensuite en tubes de gélose, ne donnent plus de culture. C'est ainsi qu'une petite quantité de vibrions sensibilisés, introduite dans le sérum neuf de cobaye additionné de sérum neuf de lapin (chauffé au préalable à 55°), s'y stérilise entièrement. Au contraire, cette même dose de vibrions, ensemencée dans le sérum de cobaye additionné non plus de sérum normal de lapin, mais d'antitoxine (chauffée à 55°), y garde sa vitalité ; les ensemencements d'un peu de ce mélange, pratiqués sur gélose à différents intervalles, donnent de nombreuses colonies.

* *

Spécificité de l'action anti-alexique de l'antitoxine. — Notre antitoxine neutralise l'alexine du sérum de cobaye. Nous avons déjà vu qu'elle n'a point d'action sur l'alexine du sérum de lapin. Agit-elle sur les alexines qu'on trouve dans les sérums d'autres espèces animales? L'expérience permet de répondre à cette question. Il suffit, étant donné le mélange type : antitoxine (chauffée à 55°), sérum frais de cobaye neuf, sensibilisatrice à dose assez forte (sérum hémolytique chauffé à 55°), mélange dans lequel les globules restent intacts grâce à l'influence de l'anti-alexine, — de préparer des mélanges analogues, mais qui contiennent, au lieu de sérum de cobaye neuf, une dose équivalente de sérum neuf d'un animal différent. Le sort de globules de lapin, introduits ultérieurement dans des mélanges ainsi préparés, nous montrera si les alexines des divers sérums neufs ont été neutralisées par l'antitoxine.

On fait parallèlement une expérience de contrôle en préparant une série de mélanges semblables, mais qui renferment, au lieu d'antitoxine, du sérum de lapin neuf (chauffé à 55°). Cette série de mélanges nous montre quelle est l'intensité de la destruction des globules sous l'action combinée de la sensibilisatrice et des sérums neufs, en l'absence d'antitoxine. Il est utile, en outre, d'avoir une troisième série de mélanges contenant chacun du sérum de lapin neuf (chauffé à 55°), ainsi que l'un des sérums neufs soumis à l'étude, mais ne renfermant point de sensibilisatrice; cette dernière série nous renseigne sur les propriétés dissolvantes que les divers sérums neufs peuvent présenter sans le concours de la sensibilisatrice. Le sang de lapin qu'on introduit dans tous ces divers mélanges a été lavé au préalable à l'eau physiologique (les globules sont ainsi débarrassés de sérum neuf de lapin).

Sans entrer dans le détail fastidieux des expériences, nous en exprimerons le résultat en disant que notre antitoxine, qui neutralise très efficacement l'alexine de cobaye, est sans action sur les alexines de rat, de chien, de lapin, de chèvre, d'oie, de poule.

Par contre, elle neutralise nettement l'alexine du sérum de pigeon. On peut donc conclure que l'action anti-alexique s'exerce

avec une spécificité assez stricte, mais qui n'est pas absolue. Sauf certaines exceptions (dont l'action sur l'alexine de pigeon nous offre un exemple), notre anti-alexine ne neutralise que l'alexine de cobaye, et respecte les alexines de nombreux animaux différents. Ces résultats confirment nettement l'idée que les sérums provenant d'espèces animales différentes ne contiennent pas la même alexine: cette notion s'imposait du reste depuis longtemps, en raison de ce fait, que les globules d'une certaine espèce sont généralement attaqués plus ou moins fortement par les sérums neufs provenant d'espèces différentes.

*
* *

Action directe de l'antitoxine sur la toxine. — Notre anti-alexine s'oppose à l'action délétère que l'alexine de cobaye peut exercer sur les globules de lapin. Dès lors, on a des raisons de croire que l'anti-alexine se combine à l'alexine, ou, si l'on veut, agit directement sur cette toxine pour la détruire ou la modifier. Mais cette conclusion ne doit pas être acceptée d'emblée avec une entière certitude. On pourrait supposer peut-être (avec peu de vraisemblance, il est vrai) que l'antitoxine n'agit pas en réalité sur l'alexine, mais qu'elle empêche par un moyen quelconque (à la vérité assez difficile à concevoir) le globule de céder à l'influence nocive de cette alexine. Le lecteur sait que divers observateurs, particulièrement MM. Cherry et Martin, dont l'étude a porté sur d'autres toxines et d'autres antitoxines, ont apporté des faits favorables à l'idée que les antitoxines agissent directement sur les toxines.

Néanmoins, il est utile de rechercher si cette idée est exacte pour ce qui concerne spécialement notre toxine et notre antitoxine. Pour y arriver, il importe, on le conçoit facilement, de pouvoir répondre aux deux questions suivantes : 1° si l'on additionne deux doses égales d'antitoxine, la première d'un peu d'alexine non chauffée, la seconde d'une même quantité d'alexine (ou sérum de cobaye neuf) rendue au préalable inactive par un chauffage à 55°, et qu'on chauffe ensuite à 55°-56° les deux mélanges obtenus, ces deux mélanges se montreront-ils, après le chauffage, identiques dans leur valeur antitoxique vis-à-vis d'une nouvelle dose d'alexine fraîche et active? Cette question peut aussi s'exprimer comme suit : lorsque l'alexine a été chauf-

fée à 55° et qu'elle a ainsi perdu sa toxicité pour le globule, neutralise-t-elle encore, *d'une manière définitive*, autant d'antitoxine qu'elle en aurait pu neutraliser si elle n'avait pas été chauffée? 2° si l'on soumet au chauffage à 55° un mélange à peu près neutre (inactif ou très peu actif vis-à-vis de globules sensibilisés, et ne manifestant plus, d'autre part, de propriétés antitoxiques intenses) d'alexine active (ou sérum neuf non chauffé) et d'antoxine, rend-on à ce mélange des propriétés antitoxiques bien accusées?

Dans le cas où l'antitoxine et l'alexine ne se seraient pas combinées, continuant à exister librement côte à côte, le chauffage, qui détruit la toxine (alexine) tout en respectant l'antitoxine, pourrait en effet faire réapparaître, dans leur intégrité, les propriétés protectrices de cette dernière. D'autre part, si l'antitoxine n'agit pas directement sur l'alexine, les deux mélanges signalés à propos de la première question doivent posséder une valeur antitoxique identique après avoir été soumis au chauffage à 55°-56°. En effet, l'état (d'activité ou d'inactivité cytolytique) où se trouvait l'alexine avant d'être mêlée à l'antitoxine ne doit pas exercer d'influence. Pour plus de clarté, nous répondrons immédiatement à ces questions, en indiquant ensuite l'expérience qui les concerne : 1° l'alexine qui a été chauffée à 55°, et qui a perdu ainsi son activité globulicide, a perdu aussi, sinon tout à fait complètement, *au moins en grande partie*, le pouvoir de saturer l'antitoxine ; 2° si l'on mélange de l'antitoxine à une dose neutralisante d'alexine fraîche, et si on chauffe ensuite ce mélange à 55°-56°, *on ne récupère pas l'antitoxine*, bien que ce chauffage soit de nature à enlever à la toxine toute son activité. L'antitoxine a donc été définitivement neutralisée.

Ces notions nous amènent toutes deux à la conclusion qu'en réalité *l'antitoxine agit directement sur la toxine* pour en annuler l'activité toxique. Elles se dégagent de l'expérience suivante :

On sait que 2 parties d'antitoxine (préalablement chauffée à 56°) neutralisent une quantité d'alexine (sérum frais de cobaye neuf) voisine de 1 partie. On prépare donc un mélange *a*) contenant 2 c. c. d'antitoxine et 1 c. c. de sérum frais de cobaye neuf. On fait de même un second mélange *b*), contenant aussi 2 c. c. d'antitoxine et 1 c. c. de sérum neuf, mais ce sérum neuf de cobaye a été préalablement porté pendant 1/2 heure à la

température de 55°,5. Comme mélanges de contrôle, on prépare en outre : *c*) mélange de 2c. c. d'antitoxine et 1 c. c. d'eau physiologique, mixture dans laquelle l'antitoxine n'est soumise à aucune influence tendant à en diminuer la puissance; *d*) mélange de 2 c. c. de sérum non antitoxique (sérum de lapin neuf chauffé à 55°) et de 1 c. c. d'eau physiologique.

On chauffe ensuite ces quatre mélanges, pendant 1/2 heure, à 55°-56°. Ce chauffage porte sur tous les mélanges, pour que toutes les conditions de l'expérience soient comparables, mais il intéresse surtout le mélange *a*) qui contenait de l'alexine fraîche qu'il s'agit de rendre inactive (si toutefois on admet qu'elle existe encore à son état primitif malgré le contact de l'antitoxine).

Le chauffage terminé, nous avons à comparer les quatre mélanges au point de vue de leur valeur antitoxique. A cet effet, on les additionne d'une dose convenable, égale pour tous, de sérum frais de cobaye neuf [1]. Enfin, on introduit dans les diverses mixtures du sang fortement sensibilisé (sang de lapin préalablement lavé à l'eau physiologique, mêlé à une forte dose de sérum hémolytique qui a été chauffé à 55°-56°). La dose de sensibilisatrice ainsi introduite est assez grande pour que l'influence antisensibilisatrice de l'antitoxine soit peu appréciable.

Il est clair que le sang va se dissoudre dans les mélanges où la toxine (alexine) nouvelle qu'on vient d'ajouter à dose convenable n'est pas neutralisée, en d'autres termes dans les mélanges qui ne contiennent pas d'antialexine active. Cette dissolution apparait très vite dans le mélange *d*) (qui n'a jamais contenu trace d'antitoxine). Au contraire les globules restent intacts dans le mélange *c*) où l'antitoxine n'a été mélangée qu'avec de l'eau physiologique. Quant aux mélanges *a*) et *b*), ils se comportent d'une manière qui n'est pas identique. Dans le mélange *b*) (contenant à l'origine du sérum antitoxique additionné de sérum de cobaye neuf préalablement chauffé) les globules restent intacts comme dans *c*), sauf qu'à la longue ils finissent par se détruire partiellement; dans le mélange *a*), où l'antitoxine avait été mélangée avec du sérum neuf non chauffé, l'hémolyse est remarquablement énergique ; le contraste entre les mélanges *a*) et *b*) est frappant. Dans le mélange *a*) il n'y a donc plus qu'une influence antitoxique très minime : le sérum neuf non chauffé a donc neutralisé, d'une manière définitive et irrévocable, très notablement plus d'antitoxine que ne l'a fait le même sérum soumis au préalable au chauffage à 55°.

Nous ne nous étendrons pas davantage sur le mécanisme suivant lequel le sérum antitoxique protège les globules contre l'hémotoxine ; nous espérons pouvoir reprendre ultérieurement l'étude de ces questions.

Mentionnons en terminant que l'antitoxine possède encore, vis-à-vis de l'agglutinine de l'hémotoxine, des propriétés anti-

1. On fait varier dans différents essais cette dose de sérum neuf qu'il est utile d'ajouter, car on dispose, bien entendu, de plusieurs mélanges *a*), de plusieurs mélanges *b*), etc...

agglutinantes. En outre, elle fait naître un précipité dans le sérum hémolytique et aussi dans le sérum neuf de cobaye ; cette propriété précipitante existe non seulement dans le sérum des lapins fournisseurs de notre antitoxine (lapins qui ont été traités par le sérum hémolytique), mais aussi dans celui de lapins qui ont été injectés simplement de sang défibriné ou de sérum de cobaye neuf. Pour ce qui concerne cette propriété, nous renvoyons à nos mémoires antérieurs[1].

§ III. — Observations relatives aux théories qui concernent l'immunité chimique.

L'immunité résulte de l'activité de la phagocytose, fonction indispensable à la destruction des éléments étrangers (microbes ou cellules) introduits dans l'organisme, et qui consiste dans l'englobement et la digestion de ces éléments. On constate fréquemment en outre, dans l'immunité et spécialement l'immunité artificielle, l'existence de matières particulières, présentes dans le sérum, et qui souvent sont capables d'exercer une influence nuisible, une sorte de digestion, sur les éléments figurés contre lesquels la vaccination a été pratiquée. Au fur et à mesure que nos connaissances se complètent et se coordonnent, on en arrive de plus en plus nettement à cette notion que ces substances actives doivent leur origine à ces mêmes cellules phagocytaires, qui veillent à la défense de l'organisme.

Les propriétés cytolytiques d'un sérum apparaissent de plus en plus comme une manifestation nouvelle de l'activité des cellules protectrices. Tout tend donc à s'harmoniser dans l'étude de l'immunité, et cette harmonie qui s'établit pouvait être prévue, les phagocytes étant, par leurs fonctions et par leur origine, ainsi que l'a montré M. Metchnikoff, de véritables cellules digestives, aptes par conséquent à créer des substances amenant la destruction et la digestion des éléments étrangers.

Mais ces substances qu'on trouve dans les sérums doivent aussi, indépendamment de leur origine, être étudiées en elles-mêmes. L'étude de cette « immunité d'ordre chimique » a con-

1. Rappelons seulement que la « propriété précipitante » d'un sérum semblable est indépendante du pouvoir antitoxique que ce sérum peut présenter. Elle n'a pas de rapports non plus avec la propriété agglutinative que ce sérum peut manifester à l'égard de globules rouges.

sisté jusqu'ici, essentiellement, dans des recherches comparatives portant sur des sérums fournis soit par des animaux neufs, soit par des animaux en état d'immunité artificielle. Pour ce qui concerne surtout ces derniers, on a pu reconnaître dans le sérum l'existence de propriétés cellulicides souvent énergiques, et qui présentent le caractère de la spécificité [1]. Mais ce n'est pas uniquement ce pouvoir cytolytique qui caractérise les immunsérums; ceux-ci possèdent encore la propriété singulière, dont MM. Fraenkel et Sobernheim ont, en 1894, fourni le premier exemple, de faire naître, lorsqu'on les injecte à un animal neuf, un pouvoir cellulicide intense dans le sérum de ce dernier. Chose remarquable, les immunsérums possèdent encore cette propriété lorsqu'on leur a fait perdre au préalable leur pouvoir cellulicide propre, ce qu'on réalise facilement en les chauffant à 55°. Pour citer l'exemple apporté par MM. Fraenkel et Sobernheim, — du cholérasérum, soit intact, soit qui a été chauffé à 55°-60°, injecté à un animal neuf, confère au sérum de celui-ci un pouvoir bactéricide intense. Autre exemple : un sérum hémolytique (provenant d'un lapin « vacciné » contre le sang de poule), injecté à un lapin neuf, confère au sérum de celui-ci un pouvoir globulicide intense vis-à-vis des hématies de poule [2]. Pour compléter ces notions, ajoutons que le sérum de l'animal neuf, injecté préalablement d'un immunsérum, possède un pouvoir cellulicide tout à fait pareil (marqué au sceau de la même spécificité) à celui qu'on pouvait constater dans l'immunsérum injecté. Comme nous l'avons montré, en 1895, un cobaye injecté d'un immunsérum actif sur le *Vibrio Metchnikovi* acquiert dans son sérum un pouvoir bactéricide atteignant le *Vibrio Metchnikovi*, ne se manifestant pas à l'égard d'autres vibrions tels que le vibrion cholérique.

Comment se décèle l'influence destructive d'un sérum cytolytique sur l'élément figuré qu'il impressionne? Quelle est la lésion subie par cet élément en présence de sérum actif, lésion dont l'existence nous permettra de constater immédiatement l'influence cellulicide? Elle variera naturellement avec la nature de l'élément figuré. Pour les microbes du groupe des vibrions, cette

1. La notion de la spécificité dans les phénomènes bactéricides est due essentiellement aux recherches de Pfeiffer.

2. Ces *Annales*, avril 1899, p. 276.

lésion consiste dans la transformation en granules : pour le globule rouge, elle consiste dans l'hémolyse. Chacun le sait, la métamorphose en granules des vibrions (vibrion cholérique, par exemple) a été vue pour la première fois par Pfeiffer dans le péritoine des animaux activement ou passivement immunisés. Ce savant admettait que cette modification du vibrion ne pouvait se produire que dans l'intérieur de l'organisme, et non *in vitro* : cette transformation du microbe décelait d'après lui une action bactéricide tout à fait particulière, spécialement inhérente à la vie de l'animal, nullement identifiable par conséquent à l'action bactéricide que le cholérasérum peut manifester *in vitro*. Il y aurait donc, d'après ce savant, deux catégories bien distinctes d'actions bactéricides, les unes observables exclusivement *in vivo* (et dénotées par la transformation du microbe en granules), les autres (moins énergiques et moins importantes) pouvant se produire *in vitro*. Si cette manière de voir eût été exacte, l'étude du pouvoir bactéricide eût été singulièrement compliquée. Mais on sait qu'elle n'est point d'accord avec les faits : M. Metchnikoff[1], dans une expérience classique et qui inaugure l'étude approfondie de ces phénomènes, *put obtenir* in vitro *la transformation granuleuse des vibrions*, en mélangeant des vibrions à un peu de cholérasérum et à une certaine quantité d'exsudat péritonéal provenant d'un cobaye neuf; nous avons montré ensuite que *le cholérasérum frais est parfaitement capable à lui seul de provoquer chez les vibrions la transformation granuleuse*, même lorsqu'il est totalement limpide et dépouvu de cellules.

Par conséquent, et c'est à cela que nous voulions en venir, l'action bactéricide d'une humeur ou d'un sérum actifs vis-à-vis du vibrion cholérique *se décèle régulièrement*, in vivo *et* in vitro, *par la transformation de ces vibrions en granules arrondis*. De même l'action cytolytique d'un sérum ou d'une humeur, actifs vis-à-vis de globules, se décèle toujours, *in vitro* comme dans le péritoine, par la destruction du globule avec diffusion de l'hémoglobine.

En résumé : *a*) les sérums que nous considérons, provenant d'animaux immunisés (activement ou passivement), sont cytolytiques, et cette cytolyse consiste dans des altérations telles que la transformation des vibrions en granules, la destruction des glo-

1. Ces *Annales*, 1895. Destruction extracellulaire des bactéries.

bules. Certaines humeurs (exsudat péritonéal) de ces animaux exercent soit *in vivo*, soit *in vitro* des effets cytolytiques tout à fait semblables ; *b*) un immunsérum déterminé, injecté à des animaux neufs, confère au sérum et à certaines humeurs (exsudat péritonéal) de ces animaux, des propriétés cytolytiques entièrement identiques à celles de l'immunsérum, et qui peuvent se manifester soit *in vivo*, soit *in vitro*. L'immunsérum qu'on injecte confère encore cette propriété remarquable, même lorsqu'il a été privé, par le chauffage à 55°-60°, de son pouvoir destructif propre.

Ce sont ces faits qui devaient être coordonnés et expliqués par une théorie. La première qui ait été proposée est celle que nous avons émise en 1895, et que nos recherches ultérieures ont pu confirmer entièrement sans rien y ajouter d'essentiel. Il nous paraissait assez superflu de la rééditer en ce moment, attendu que nous l'avons exposée ou résumée à plusieurs reprises [1]. Toutefois cette théorie ne rencontre pas encore l'adhésion unanime ; d'autres observateurs lui préfèrent une théorie bien différente ; c'est pourquoi nous croyons utile d'y revenir encore et d'examiner en même temps les conceptions qui lui ont été opposées.

*
* *

Théorie de Bordet (1895). — Notre manière de voir, telle que nous l'avons exprimée il y a cinq ans, est basée sur la possibilité (démontrée en premier lieu par M. Metchnikoff) d'obtenir *in vitro* la transformation granuleuse des vibrions, et spécialement sur les faits suivants, que nous avons fait connaître à cette époque :

1° Le choléraséum frais transforme en granules le vibrion cholérique ; cette modification *in vitro* est entièrement identique à celle que Pfeiffer a le premier observée *in vivo*, dans le péritoine ; elle présente, au même degré, le caractère de la spécificité, et peut servir de même au diagnostic des vibrions. En outre, le choléraséum possède, même à petite dose, le pouvoir d'agglomérer en amas une culture de vibrions [2] ;

1. Ces *Annales* 1895 (Les leucocytes et les propriétés actives du sérum). — *Annales de la Société des Sc. nat. et méd. de Bruxelles*, 1895. — Ces *Annales*, 1896 (Mode d'action des sérums préventifs, p. 216 et 217). — Ces *Annales* 1898 (Agglutination et dissolution des globules rouges) et 1899, page 279.

2. C'était là le premier exemple de l'agglutination rapide d'une culture sous l'influence d'une dose même faible du sérum spécifique.

2° Chauffé à 55°, le cholérasérum perd (en même temps que tout pouvoir bactéricide), le pouvoir de transformer les vibrions. Dans ces conditions, il reste agglutinant ;

3° Le cholérasérum ainsi traité récupère toute son énergie bactéricide première par l'addition de sérum neuf, qui pourtant n'est par lui-même que faiblement bactéricide. Une petite quantité de cholérasérum soit intact, soit qui a été chauffé à 55°, suffit ainsi à conférer, à une dose assez forte de sérum neuf, un pouvoir bactéricide intense et spécifique, qui se traduit par la transformation des vibrions cholériques en granules[1] ;

4° Par lui-même et sans le concours du cholérasérum, le sérum neuf est capable de provoquer, à un faible degré tout au moins, la transformation des vibrions, surtout si ceux-ci sont atténués;

5° Soumis au chauffage à 55°, le sérum neuf perd cette propriété et devient en même temps incapable de restituer l'activité bactéricide au cholérasérum qui a été chauffé à 55°.

La théorie fondée sur ces faits principaux consiste dans les deux propositions suivantes :

A) Le pouvoir bactéricide du cholérasérum (ou d'autres sérums similaires) est dû à l'existence, dans ce sérum, de deux substances bien distinctes : la première qu'on peut appeler substance préventive ou anticorps (nous l'appelons maintenant sensibilisatrice), est spéciale à l'immunsérum et le caractérise ; elle est spécifique ; elle résiste à l'action d'une température de 55°-60° ou même davantage. L'autre, qu'on peut appeler substance bactéricide proprement dite ou alexine, existe aussi bien dans le sérum neuf que dans le sérum des vaccinés : elle se détruit à 55°. Il faut, pour que le pouvoir bactéricide se manifeste énergiquement et avec spécificité, que ces deux substances soient toutes deux présentes dans le sérum. En chauffant le cholérasérum à 55°, on n'en détruit pas la matière préventive, mais on le prive de son alexine. Celle-ci existant dans le sérum neuf, il suffit pour rendre au cholérasérum chauffé son activité première, de l'additionner de sérum neuf[2]. Grâce à ce mélange, le cholérasérum

1. C'est un semblable mélange que nous recommandions, à cette époque, pour la pratique du diagnostic, *in vitro*, du vibrion cholérique.

2. Nous avons constaté, avec surprise, que certains auteurs, spécialement en Allemagne, écrivent à propos de ces notions un historique fort inexact, attribuant parfois l'étude de ces faits à des auteurs qui n'ont abordé ces questions que tout à fait récemment.

possède de nouveau les deux substances dont le concours est nécessaire à la bactériolyse intense et spécifique.

La matière préventive (ou, si l'on veut, le choléra-sérum qui a été chauffé à 55°-56°) n'est nullement bactéricide. Quant au sérum neuf, il possède par lui-même, grâce à l'alexine qu'il con-

En conséquence, nous nous permettons de citer textuellement certains passages de notre mémoire de 1895. (Ces *Annales.*) On lit, page 480 et 481 : «... Tout se passe comme si la matière bactéricide des animaux vaccinés et celle des animaux neufs, bien que l'une soit active et spécifique et que l'autre ne possède pas ces caractères, étaient cependant identiques. Peu active dans le sérum neuf, cette matière agit énergiquement dans le sérum des vaccinés, sous l'influence de la matière préventive qui, se trouvant à côté d'elle, en exalte le pouvoir et en même temps communique l'impulsion spécifique.

Il suffit en effet d'ajouter à du sérum neuf, par lui-même peu bactéricide, une petite quantité de sérum anticholérique soit frais, soit préalablement chauffé vers 60° et dénué ainsi d'action nocive envers les vibrions, *pour lui communiquer un pouvoir bactéricide très marqué.* Donc deux liquides, bactéricides à peine isolément, forment un *mélange fortement antiseptique.* Ce pouvoir antiseptique, nous le verrons plus loin, est spécifique... On peut exprimer le fait en d'autres termes, en disant qu'il suffit, après avoir chauffé du sérum préventif, d'y ajouter du sérum neuf, pour lui rendre son pouvoir bactéricide intense et spécifique... Il suffit d'une très petite quantité de sérum préventif pour rendre le sérum neuf fortement bactéricide ; ce pouvoir se constate par la méthode des ensemencements successifs sur plaques, mais on peut le déceler aussi en ajoutant au mélange une gouttelette de liquide tenant en suspension les vibrions ; ceux-ci se transforment rapidement en granulations. Le « phénomène de Pfeiffer » se produit ainsi *in vitro;* nous reviendrons plus loin sur ce point. De même qu'une petite dose de sérum préventif, qui vaccine les animaux, leur confère le pouvoir bactéricide vis-à-vis du vibrion, de même une trace de ce liquide « vaccine » en quelque sorte le sérum neuf, en lui donnant un pouvoir bactéricide intense à l'égard de ce même vibrion. »

Page 499 : « Le *sérum des animaux vaccinés ne possède pas de substance bactéricide qui lui soit particulière;* la *substance bactéricide, toujours la même, est répandue dans le sang neuf comme dans celui des organismes immunisés.*

Lorsqu'elle n'est point mélangée à la matière préventive, *elle n'est point spécifique,* et ne manifeste beaucoup d'activité qu'à l'égard des vibrions très atténués. Il lui faut, pour que son action soit énergique, la *présence simultanée d'une substance préventive, dont seul le sérum des vaccinés est largement doté.* Peut-être cette matière préventive spécifique *exerce-t-elle par elle-même sur les vibrions une certaine influence défavorable, qui les prédispose à ressentir plus vivement le pouvoir de la substance bactéricide.* On peut en tous cas lui dénier les propriétés d'un réel antiseptique, car elle est incapable de stériliser un ensemencement peu abondant, et même de s'opposer à la multiplication... A l'état frais, le sérum des vaccinés *possède à la fois ces deux substances;* conservé pendant longtemps ou chauffé à 55° pendant quelques minutes, il ne possède plus que la substance préventive ; pour lui rendre son énergie antiseptique, il faut lui ajouter du sérum frais. Et il est indifférent alors que la matière bactéricide de ce sérum frais provienne d'un animal neuf, d'un animal vacciné contre l'un ou l'autre vibrion, ou même d'un organisme qui vient de succomber à des infections telles que le charbon, etc... En outre, on peut admettre (conformément à une expérience citée dans le texte) que la quantité de substance bactéricide renfermée dans le sérum de vaccinés, bien que paraissant plus grande, n'est pas considérablement supérieure à celle que contient le sérum neuf (page 500).

Nous rappelons plus loin, dans le texte du présent article, d'autres citations, spécialement celle qui précise l'idée de l'unité de la substance bactéricide des divers immunsérums, et celle qui explique l'apparition du pouvoir bactéricide dans les humeurs des animaux passivement immunisés.

tient, une certaine activité bactéricide, assez légère en général, qui n'est pas spécifique et se manifeste sur des microbes divers, surtout sur les microbes atténués. Mais, en présence de la matière préventive d'un immunsérum déterminé, l'alexine attaque spécifiquement, avec une extrême énergie, la race déterminée de microbes vis-à-vis de laquelle l'immunsérum est actif. Ainsi, le sérum neuf, en présence de la matière que le choléra-sérum possède encore après avoir été chauffé à 55°, attaque énergiquement le vibrion cholérique, sans que son activité envers d'autres microbes soit augmentée.

En résumé, la matière préventive (anticorps) nullement bactéricide par elle-même, agit spécifiquement sur l'élément figuré, en favorisant beaucoup, en exagérant considérablement l'action altérante que l'alexine peut manifester à l'égard de cet élément. Nous appelons maintenant la matière préventive, sensibilisatrice, (sensibilisant l'élément à l'action de l'alexine).

Disons-le immédiatement pour plus de clarté, nous avons fait voir en 1898, lorsque nous avons fait connaître les sérums hémolytiques, que toutes ces notions et en général celles qui vont suivre, concernent aussi bien les sérums spécifiques actifs vis-à-vis des globules, que les sérums bactériolytiques étudiés en premier lieu. Nous avons été suivi en cela par la plupart des observateurs qui se sont occupés ensuite des sérums hémolytiques, en particulier par MM. Ehrlich et Morgenroth. Rien n'est changé dans les phénomènes, sauf la nature de la cellule sensible, l'hémolyse correspondant à la bactériolyse.

B) Quand on injecte un immunsérum, tel que le choléra-sérum, à un animal neuf, c'est l'introduction de la matière préventive (sensibilisatrice) qui communique aux humeurs de ce dernier le pouvoir bactéricide spécifique. L'introduction de l'alexine (que l'immunsérum contient aussi lorsqu'il est frais) n'a pas d'importance à cet égard. Aussi, les phénomènes sont-ils les mêmes lorsqu'on injecte l'immunsérum après l'avoir chauffé à 55°. Comme nous le disions dans notre article de 1895 : « On conçoit nettement pourquoi la présence de cette matière bactéricide (alexine) n'est pas indispensable à l'activité du sérum préventif. Elle n'est pas spéciale à ce sérum, elle existe dans le sérum neuf. L'animal neuf à qui l'on injecte le cholérasérum possède déjà cette matière : il est inutile de lui en fournir une

quantité additionnelle. Ce que l'animal neuf ne possède pas, c'est la substance préventive ; c'est cette dernière par conséquent qu'il importe de lui donner. » Dès qu'il a reçu la matière préventive, l'animal possède désormais les deux substances nécessaires à la production de phénomènes bactériolytiques intenses et spécifiques. Si nous saignons l'animal, il nous donnera un sérum contenant non seulement de l'alexine (comme en contient le sérum neuf), mais aussi une certaine dose de matière préventive; ce sérum se montrera actif vis-à-vis du vibrion. « C'est la rencontre de deux substances qui provoque dans l'organisme, comme dans un tube à réactifs, l'énergique pouvoir bactéricide. » (*Loc. cit.* p. 506.)

Nous l'avons dit plus haut, cette théorie, résumée ici telle que nous l'avons énoncée autrefois, s'applique entièrement aussi aux sérums hémolytiques[1]. La notion dominante qui lui sert de base est que la matière bactéricide (ou cellulicide) conférant aux divers immunsérums leurs propriétés cellulicides respectives est toujours la même, toujours semblable à celle qu'on trouve dans le sérum neuf; c'est l'alexine. C'est là le *principe de l'unité de la matière cytolytique*, principe que nous exprimions en 1895, en disant que chez les animaux neufs ou vaccinés, « la matière bactéricide est très généralement la même, quel que soit d'ailleurs le microbe qui ait fait invasion dans les tissus. Chez les animaux vaccinés respectivement contre certaines infections, l'énergie de la substance bactéricide se fait sentir plus vivement contre tel microbe en particulier, et cela sous l'influence de la matière préventive spécifique, variable suivant les cas, et dont la nature dépend de celle du microbe qui a servi à l'immunisation. *C'est par l'intermédiaire de cette singulière substance, la matière préventive, que l'organisme dirige son pouvoir destructif spécialement contre un virus déterminé* [2] ».

Il est évident qu'il faut actuellement remplacer dans cet énoncé le mot microbe par le terme élément figuré (pouvant être un microbe ou une hématie). Il faut d'autre part faire cette

1. Il est probable qu'elle s'appliquera aussi aux divers immunsérums, actifs vis-à-vis d'autres cellules (par exemple sérum spermotoxique découvert par M. Landsteiner, sérum leucotoxique de M. Metchnikoff, sérum épithéliotoxique de M. Von Dungern).

2. Contribution à l'étude du sérum chez les animaux vaccinés. *Annales de la Société royale des sciences naturelles et médicales de Bruxelles*, 1895.

réserve que si l'alexine est identiquement la même dans un sérum neuf et un immunsérum provenant tous deux d'une même espèce animale, il existe d'autre part des différences entre les alexines fournies par des espèces différentes, différences qui se révèlent surtout dans l'étude de l'hémolyse. Cependant les alexines ont, chez les différents animaux, les mêmes caractères essentiels. — Nous avons fait antérieurement une autre réserve, c'est que certains sérums neufs renferment parfois, *à côté de l'alexine*, d'autres matières bactéricides, entièrement différentes, et d'un intérêt moins général. Par exemple, la matière bactéricide qu'on trouve dans le sérum de rat, et qui détruit la bactérie charbonneuse, n'est certainement pas une alexine [1].

Quant à l'identité absolue, chez la même espèce animale, de l'alexine hémolytique et de l'alexine bactériolytique, nous croyons l'avoir solidement établie au cours du présent mémoire.

En outre, le fait que « c'est par l'intermédiaire de la sensibilisatrice que l'organisme dirige son pouvoir cellulicide spécialement contre un élément figuré déterminé », ce fait est entièrement confirmé par les expériences mentionnées dans la première partie du présent article, expériences prouvant que non seulement le *même sérum neuf* (ce que nous savions depuis longtemps), mais la *même alexine* (ce qui est plus précis) détruisent tantôt le vibrion, tantôt les hématies, suivant qu'on fait intervenir soit l'hémo, soit la choléra-sensibilisatrice.

*
* *

Notre théorie implique forcément deux affirmations :

La première est que les phénomènes cytolytiques qu'on peut observer *in vitro*, en mettant l'élément sensible en contact avec les deux substances du sérum actif, sont tout à fait comparables, comme nature et comme intensité, à ceux que cet élément peut subir *in vivo* (dans le péritoine), en présence de ces deux mêmes substances. Cette conséquence se vérifie par l'expérience, à condition, bien entendu, que l'élément soit placé, *in vitro* comme *in vivo*, au contact de quantités identiques ou au moins comparables des deux substances actives. Par exemple, si on mélange

1. Le sérum de rat possède d'ailleurs, outre cette matière spéciale, une alexine tout à fait comparable à celle des autres sérums, douée des mêmes caractères. Voir notre note dans ces *Annales* 1899, page 291.

à des vibrions la quantité minimale de sensibilisatrice (choléra-sérum chauffé à 55°), permettant à ces vibrions de se transformer en granules sous l'influence d'une addition d'alexine (sérum neuf), on trouve que cette dose de sensibilisatrice se rapproche beaucoup de la dose minimale qu'il faut ajouter à une même quantité de vibrions, pour qu'ils puissent se transformer en granules lorsqu'on les injecte dans le péritoine d'un animal neuf, c'est-à-dire lorsqu'on les met en présence de l'alexine contenue dans l'exsudat péritonéal. Nous avons brièvement mentionné ce fait antérieurement.

Une seconde affirmation est la suivante : lorsqu'on injecte un immunsérum à un animal neuf, cet animal neuf se comporte comme le dépositaire passif de la sensibilisatrice.

L'organisme reçoit cette substance, mais ne la modifie pas; celle-ci se dilue dans les humeurs et surtout dans le sang. Aussi le sérum, extrait ultérieurement à cet animal neuf, doit se comporter comme le ferait une dilution de la sensibilisatrice (ou d'immunsérum) dans du sérum neuf. Nous croyons avoir démontré l'exactitude de cette assertion, qui découle forcément de notre théorie [1]. Nous avons montré autrefois que cette assertion se vérifie pour ce qui concerne la propriété agglutinante [2].

*
* *

Théorie de Pfeiffer (1896). — La théorie dont l'exposé précède ne fut pas la seule que suscita l'étude des sérums bactéricides. L'année suivante, M. Pfeiffer émit, pour expliquer la transformation granuleuse des vibrions *in vitro*, une manière de voir qui s'écarte considérablement de la nôtre sur plusieurs points importants.

M. Pfeiffer, qui a étudié avec tant de soin les phénomènes bactériolytiques que présentent les vibrions dans la cavité péritonéale des animaux immunisés, établit une distinction assez tranchée entre ces phénomènes et les actions microbicides observables *in vitro* : celles-ci seraient en général, d'après ce savant, beaucoup moins énergiques. D'après M. Pfeiffer, les

1. Voir ces *Annales*, 1899, pages 276 à 278. Nous profitons de l'occasion pour rectifier, dans ce passage, une erreur d'impression qui le rend peu compréhensible. Page 277, ligne 3, au lieu de « trois ou quatre parties de sang de lapin », il faut lire « trois ou quatre parties de sang de poule ».

2. Mode d'action des sérums préventifs. Ces *Annales*, 1896.

animaux vaccinés contre le vibrion possèdent un anticorps spécifique qui peut se rencontrer sous deux formes, une forme inactive, stable (sous cette forme l'anticorps peut se conserver longtemps), une forme active ou très bactéricide, beaucoup moins stable. L'anticorps peut passer facilement de l'une à l'autre de ces deux formes. La transformation de la forme inactive en forme active s'effectue aisément sous l'influence d'une substance-ferment d'origine cellulaire ; elle se produit facilement surtout dans l'organisme, de sorte que celui-ci peut mettre en œuvre, contre les vibrions, l'anticorps sous sa forme active et très bactéricide. Au contraire, le sérum renfermerait l'anticorps sous sa forme stable, inactive, forme sous laquelle l'organisme emmagasine l'anticorps et le conserve pour les besoins à venir. Sous cette forme, l'anticorps serait incapable de détruire activement les vibrions. Certes, M. Pfeiffer ne nie pas que la transformation des vibrions en granules puisse s'observer *in vitro*, dans le cholérasérum frais. Mais M. Pfeiffer explique ce fait en admettant que le sérum, lorsqu'il est bien frais, contient toujours une certaine dose de la substance-ferment; grâce à la transformation opérée par cette dernière, l'immunsérum frais (ou additionné de sérum frais) contient de la sorte un peu d'anticorps actif et bactéricide. On voit que, pour expliquer le phénomène bactéricide *in vitro*, M. Pfeiffer paraît se rallier à notre manière de voir, en ce sens qu'il admet, pour la production de la bactériolyse *in vitro*, le concours de deux substances. Mais cette ressemblance entre les deux théories n'est que superficielle.

En effet, d'après M. Pfeiffer et ses élèves, la substance qui existe dans le sérum bien frais (et qui a reçu le nom d'alexine) ne serait pas, à proprement parler, une matière bactéricide; elle serait le ferment capable de transformer la forme inactive de l'anticorps en forme active. Lorsque la transformation des vibrions en granules s'observe *in vitro* dans le cholérasérum frais, les vibrions se détruiraient sous l'influence de l'anticorps actif, et non point par l'action directe de l'alexine, celle-ci n'intervenant que pour faire apparaître l'anticorps actif. En conséquence, la matière cellulicide proprement dite serait toujours spécifique ; au lieu d'être la même dans les divers immunsérums, ainsi que nous l'admettons, elle varierait de l'un de ces

sérums à l'autre, les divers immunsérums ayant des anticorps différents.

Mais si l'alexine n'intervient pas directement, par ses propriétés destructives propres, dans les altérations subies par les vibrions ou les globules, pourquoi les sérums neufs, qui ne contiennent pas de ces anticorps spécifiques produits par la vaccination, pourquoi les sérums neufs peuvent-ils exercer sur les vibrions une influence bactéricide (transformation granuleuse) certes beaucoup moins intense, mais comparable dans sa nature à celle que manifeste l'immunsérum le plus fort? Pourquoi peuvent-ils (fait sur lequel Buchner a tant insisté dans ses belles recherches [1]) provoquer à un certain degré le phénomène de l'hémolyse?

Cette hémolyse, plus faible assurément, est néanmoins comparable à celle qu'opèrent les sérums hémolytiques. L'immunisation artificielle, qui se signale par la production d'anticorps spécifiques, ne crée pas la cytolyse, elle se borne à la rendre spécifiquement plus énergique, grâce à l'influence d'une sensibilisatrice ou anticorps spécifique. Tout ceci tend à faire rejeter la théorie de M. Pfeiffer.

Cette théorie présenterait certes une réelle vraisemblance si les phénomènes cytolytiques, produits *in vitro* par les immunsérums, étaient beaucoup moins intenses que ceux provoqués par ces sérums à l'intérieur de l'organisme (cavité péritonéale). Mais cette différence d'intensité, nous le répétons, ne s'observe pas. Certes, si l'on prépare *in vitro* un mélange d'une quantité assez considérable de vibrions et d'une dose de choléraséruminsuffisante à produire l'effet bactéricide, et qu'on injecte ensuite ce mélange dans le péritoine d'un animal neuf, il arrive souvent que la transformation en granules, absente dans le mélange avant l'injection, apparaît dans l'organisme. Mais il est de toute évidence qu'en injectant ce mélange, on l'a mis en contact avec une quantité d'alexine nouvelle, celle de l'exsudat péritonéal; on a donc augmenté la quantité de l'une des deux substances nécessaires à la destruction des vibrions; il n'est pas étonnant que ceux-ci souffrent davantage [2]. Pour apprécier l'activité bac-

1. On le sait, c'est M. Buchner qui a mis en lumière, il y a longtemps déjà, ce fait fondamental qu'un sérum neuf chauffé à 55° perd à la fois ses propriétés bactéricides et globulicides.

2. Nous rappelons au lecteur, avec une certaine insistance, cette notion (dé-

téricide, soit *in vitro* soit *in vivo*, il faut dans l'un et l'autre cas mettre les vibrions en présence de quantités comparables des deux substances actives ; en se conformant à cette précaution, on constate que les vibrions, ou les globules, s'altèrent *in vitro* comme dans le péritoine.

Les propriétés de l'antitoxine étudiée au cours des pages précédentes suggèrent une objection nouvelle à la théorie de M. Pfeiffer.

Mélangeons à une certaine quantité (0.4 c. c. par exemple) de sérum hémolytique préalablement chauffé à 55° (sensibilisatrice) un peu de sérum frais de cobaye neuf (0,2 c. c.). Préparons d'autre part des mélanges, en quantités correspondantes, de la même sensibilisatrice avec du sérum neuf de lapin ou de rat. Nous constatons que de tels mélanges sont tous fortement hémolytiques pour les globules de lapin, bien que les divers sérums neufs et la sensibilisatrice soient isolément peu ou pas globulicides. Que s'est-il passé d'après la théorie de M. Pfeiffer? Les alexines de cobaye, ou de rat, ou de lapin, ont transformé l'anticorps inactif, stable et résistant à la chaleur (sensibilisatrice), en anticorps actif et globulicide spécifique. Dans tous les mélanges, c'est par conséquent toujours cet anticorps actif, et non l'alexine, qui détruit les globules. Nous pouvons même ajouter que c'est le mélange de sensibilisatrice et de sérum neuf de cobaye qui contient la plus forte dose de cet anticorps actif ; en effet, l'expérience le montre, c'est ce mélange qui détruit les globules le plus rapidement.

Or, si tous les mélanges contiennent la même substance hémolytique spécifique, on doit prévoir qu'une antitoxine capable d'annuler l'activité de l'un de ces mélanges devra neutraliser de même, d'après la théorie de M. Pfeiffer, l'activité globulicide des autres mixtures. Ajoutons donc au mélange le plus

montrée dans notre article de 1895) qu'un immunsérum frais (tel que le choléra-sérum) ne contient pas considérablement plus d'alexine que n'en contient le sérum neuf. Par contre, sa fonction sensibilisatrice est très puissante, de sorte que l'immunsérum peut sensibiliser plus de microbes qu'il n'en peut détruire au moyen de son alexine. En d'autres termes, la dose d'alexine contenue dans un volume déterminé d'immunsérum est trop faible pour détruire tous les vibrions que ce volume pourrait sensibiliser. C'est pourquoi ce volume de choléra-sérum peut détruire beaucoup plus de vibrions lorsqu'on l'additionne de sérum neuf, qui fournit une quantité complémentaire d'alexine. Nous avons exprimé plus haut, en termes différents, cette même notion. En rappelant les faits qui servent de base à notre théorie, nous disions en effet qu'une faible dose d'immunsérum suffit à conférer un pouvoir bactéricide intense à une dose assez forte de sérum neuf.

fortement hémolytique, celui qui contient la sensibilisatrice et le sérum de cobaye, une certaine dose (0,8 c. c.) de notre antitoxine, préalablement chauffée à 55°. Nous constatons que le mélange ne détruit plus les globules de lapin. Additionnons de même les autres mélanges, renfermant les sérums neufs de lapin ou de rat, d'une même dose d'antitoxine. L'activité hémolytique de ces derniers mélanges *n'est nullement neutralisée*. Le résultat de l'expérience [1] est donc contraire à celui qu'on attendait en raisonnant d'après la théorie de M. Pfeiffer. Il est d'autre part aisé de comprendre ce résultat d'après notre manière de voir : les diverses alexines agissent directement sur les globules sensibilisés, et les détruisent. Mais notre antitoxine neutralise exclusivement l'alexine de cobaye, car elle provient de lapins « vaccinés » contre cette dernière, et qui n'ont jamais été traités par l'alexine de rat.

*
* *

Nous bornons là nos remarques relatives aux théories des sérums cytolytiques. En résumé, la théorie que nous avons émise en 1895 explique, pensons-nous, les faits observés; elle n'est en désaccord avec aucun. Au point de vue général, cette théorie (ainsi que les faits qui lui servent de base) a pu établir trois notions que nous rappelons encore au lecteur :

1° L'immunisation artificielle se borne à rendre spécifiquement plus intenses les manifestations cytolytiques que peut exercer déjà le sérum des animaux neufs. Cette notion s'est trouvée démontrée lorsque nous avons fait voir qu'un sérum neuf et un immunsérum, tel que le cholérasérum, exercent tous deux sur les vibrions une influence bactéricide d'intensité inégale, mais se caractérisant toujours par la même lésion du microbe (transformation granuleuse). Elle s'est trouvée confirmée lorsque nous avons pu exalter, en soumettant les animaux à une véritable vaccination contre les globules rouges, la propriété hémolytique déjà présente dans le sérum neuf ;

2° L'animal soumis à l'immunisation artificielle ne change rien (à part une légère augmentation en quantité) à la matière

1. L'expérience comporte naturellement des mélanges de contrôle, qu'on additionne, non pas d'antitoxine, mais de sérum neuf de lapin (chauffé également à 55°). Dans ces conditions, l'activité hémolytique persiste dans tous les mélanges ; elle est intense surtout dans celui qui contient le sérum neuf de cobaye.

cytolytique qu'il possédait avant toute intervention. Il se borne à produire en abondance une substance favorisant, d'une matière spécifique, l'activité de la matière cytolytique [1] ;

3° La réaction d'immunité (consistant dans la production d'anticorps) qu'on observe chez l'animal à la suite de l'injection d'éléments non dangereux, tels que les globules rouges, est identique à celle que l'animal peut manifester vis-à-vis de virus, contre lesquels il a le plus grand intérêt à se protéger définitivement.

CONCLUSIONS

Nous ne citons ici que les faits soumis, dans les deux premiers chapitres du présent article, à une démonstration expérimentale :

1° Des globules impressionnés par une même sensibilisatrice peuvent se détruire, sinon dans toutes, au moins dans diverses alexines (sérums neufs) provenant de nombreux animaux différents ;

2° Dans un même sérum, l'alexine bactériolytique est identique à l'alexine hémolytique ;

3° Il convient d'attribuer à leurs stromas les propriétés fixatrices que les hématies manifestent vis-à-vis des substances actives des sérums hémolytiques. Cette fixation paraît se rapprocher des phénomènes de teinture ;

4° On peut préparer une antitoxine active vis-à-vis d'un sérum hémolytique. Cette antitoxine manifeste une propriété antisensibilisatrice et une propriété anti-alexique ;

5° Grâce à sa fonction anti-alexique, l'antitoxine est à la fois antihémolytique et antibactéricide ;

6° On peut admettre que l'anti-alexine agit directement sur l'alexine pour la neutraliser ;

7° L'anti-alexine considérée est spécifique, mais cette spécificité n'est pas absolue. Elle neutralise l'alexine de cobaye, sans influencer la plupart des alexines provenant d'animaux différents.

1. Le *mécanisme* suivant lequel la substance sensibilisatrice favorise l'action de l'alexine a été, dans les derniers temps, l'objet de recherches intéressantes. Il faut citer tout particulièrement, à cet égard, les recherches de MM. Ehrlich et Morgenroth, dont il a été question dans le cours du présent article.

CONTRIBUTION

A L'ÉTUDE DES SÉRUMS ANTIHÉMATIQUES

PAR LE Dr P. NOLF

(Travail du laboratoire de Physiologie de l'Université de Liége.)

La propriété que possède le sérum de certains animaux de détruire les globules rouges d'autres animaux a été attribuée par Buchner à des substances protéiques, qu'il a appelées alexines. Ces alexines sont caractérisées avant tout par leur fragilité vis-à-vis de la chaleur (une température de 55°-56° suffit pour les détruire). On leur a attribué, sans grandes raisons, le caractère d'enzymes.

Ces alexines globulicides sont à rappocher des alexines microbicides, qùi agissent à l'égard de certains microbes comme les premières vis-à-vis des globules rouges. Dans la majorité des cas, l'action de ces substances tant globulicides que microbicides est assez faible, et il faut qu'elles soient en concentration forte pour produire leur effet. Bordet (1) a montré que l'action beaucoup plus intense qu'exerce le sérum frais d'un animal vacciné contre certains microbes, ceux du choléra par exemple, est due à une collaboration entre les alexines normales et une substance nouvelle, *créée par la vaccination*, dont l'action sur le microbe sensibilise ce dernier vis-à-vis de l'alexine. Cette substance sensibilisante, découverte par Pfeiffer et nommée *anticorps* par ce dernier, est *spécifique*, c'est-à-dire qu'elle exerce uniquement son action sur l'espèce microbienne qui a servi lors de la vaccination.

Il existe dans certains sérums une autre propriété, celle d'agglutiner, de réunir en paquets les globules rouges d'autres espèces. Et ce pouvoir agglutinant normal s'exerce également vis-à-vis de certains microbes. La vaccination contre un microbe a pour effet fréquent de créer cette faculté ou de l'augmenter dans des proportions considérables, quand elle

préexistait. Les agglutinines spécifiques, produites par la vaccination, sont-elles, dans ce dernier cas, identiques à celles qui se trouvaient déjà dans le sérum normal? Sont-elles un produit de la vaccination au même titre que les anticorps? C'est ce que nous ignorons.

Bordet (2), frappé de l'analogie d'action du sérum normal sur les microbes et les globules, se demanda si la vaccination contre les globules aurait les mêmes effets que la vaccination contre les microbes. Ayant donc injecté du sang de poule dans le péritoine de lapin, il constata effectivement que le sérum des lapins vaccinés se comportait vis-à-vis des globules de la poule comme le sérum d'un cobaye immunisé contre le choléra vis à-vis du virus cholérique, c'est-à-dire que la vaccination avait ici aussi produit les anticorps et les agglutinines spécifiques.

Ehrlich et Morgenroth (3) ont confirmé ces faits, et de plus ils ont montré que l'anticorps se fixe sur les globules rouges d'une façon assez solide pour que des lavages répétés au moyen de la solution physiologique de chlorure sodique ne puissent plus l'enlever. Ces globules ainsi imprégnés et lavés, placés dans du sérum normal frais (qui n'aurait sur des globules normaux que peu ou pas d'action), s'y dissolvent très rapidement.

Von Dungern (4) et Landsteiner (5) ont pu constater chez d'autres espèces animales l'exactitude de ces résultats.

La vaccination d'un mammifère ou d'un oiseau au moyen du sang d'une espèce différente ne donne pas toujours les mêmes résultats. L'une ou l'autre des propriétés agglutinante ou hémolytique peut faire défaut, ou être moins développée. Ehrlich et Morgenroth ont montré que l'injection de sang de mouton à des chèvres amenait la production d'anticorps seul, sans agglutinine, tandis que, d'après Landsteiner, l'injection de sang de chien et de cheval à des lapins aurait surtout pour conséquence la formation d'agglutinine.

Des résultats très complets s'obtiennent par l'injection de sang défibriné de poule à des lapins. Bordet (6), qui a étudié ce cas, distingue dans le sérum des lapins vaccinés trois propriétés nouvelles. Le sérum devient agglutinant, globulicide, et de plus, mélangé au sérum de poule, il précipite ce dernier, alors que le mélange des sérums de lapin normal et de poule reste parfaitement limpide.

Cette propriété précipitante a été observée d'abord par Tchistovitch (7), qui l'a trouvée chez des lapins vaccinés avec du sérum de cheval et d'anguille. Les premiers avaient un sérum troublant et précipitant, le sérum de cheval; le sérum des seconds agissait de même sur le sérum d'anguille.

Dans les recherches exposées dans ce mémoire, je me suis proposé pour but de tâcher d'analyser et de séparer les propriétés nouvelles que l'on rencontre chez le lapin injecté de sang de poule.

Le sang de poule constitue un mélange complexe, et il était intéressant de voir si l'injection partielle de ses éléments constituants aurait pour résultat une dissociation entre les fonctions précipitante, agglutinante et hémolytique. Les résultats des auteurs précédents tendaient plutôt à faire croire qu'une telle dissociation ne s'effectuait pas. Ainsi, Tchistovitch signale chez le lapin injecté de sérum de cheval *privé de globules*, à côté de la propriété précipitante, l'agglutination et la dissolution des globules. Von Dungern trouve que le sérum de cobayes, injectés de sérum de poule, est hémolytique pour les globules de cet animal. Ayant étudié d'autre part l'action de l'hémoglobine et des stromas isolés, il dit que leur injection a un résultat nul. Au contraire, l'injection du mélange produit la propriété agglutinante seule.

Les résultats de Tchistovitch tendaient donc à faire croire que l'injection d'une partie du sang, le sérum, avait le même résultat que l'injection du sang total. Ceux de Von Dungern attribuaient à l'injection du sérum la propriété de produire l'apparition du pouvoir globulicide, aux constituants globulaires, l'agglutination.

Ces données expérimentales cadraient très mal avec nos idées sur la spécificité des sérums acquise par l'immunisation contre les toxines et les microbes.

Il me sembla utile de les examiner de plus près.

I

La première question à résoudre avait trait au pouvoir précipitant vis-à-vis du sérum. Il est facile de séparer à la turbine sérum et globules du sang de poule ou, mieux encore,

quand on travaille vite, plasma et globules, étant donnée la coagulation lente du sang de poule reçu dans des vases propres, à travers des canules de verre (8). On soutire 10 c. c. de sang à une poule, le sang étant recueilli dans trois ou quatre volumes de solution de NaCl à 1 0/0.

On sépare rapidement globules et plasma dilué : les globules sont débarrassés par deux lavages du plasma encore adhérent, et plasma et globules sont injectés séparément dans la cavité péritonéale de 2 lapins différents. Cette injection ayant été renouvelée 4 à 6 fois à des intervales de 4 à 5 jours, on examine les propriétés du sérum des deux lapins au point de vue précipitant. Le résultat est très décisif. *Seul le sérum du lapin ayant reçu le plasma est actif :* mélangé avec du sérum de poule, il donne instantanément un trouble qui se résout plus tard en flocons. Le sérum du lapin injecté de globules ne se comporte pas autrement que le sérum normal.

Quand, par des injections de sang défibriné, Bordet a provoqué l'apparition de la qualité précipitante, la partie uniquement active à ce point de vue dans le mélange injecté était donc le sérum, et, dans la réaction générale de l'organisme aboutissant à trois nouvelles propriétés, il en était au moins une que son origine nettement spécifique permettait de différencier.

On obtient un résultat tout à fait analogue si, à des lapins, on injecte du sérum ou des globules de chien. Les lapins injectés de sérum de chien possèdent également un sérum qui précipite celui du chien, à un degré moindre cependant que ce qui s'observe pour le sérum de poule. Ceux, au contraire, auxquels on a injecté les globules ont un sérum dont le mélange avec le sérum de chien ne produit aucun trouble. Il est probable que la règle est générale, et que les propriétés nouvelles vis-à-vis du sérum d'un sang étranger que l'on injecte à un animal sont dues uniquement à l'injection du sérum de ce sang, et que les globules n'interviennent jamais dans leur production.

Une question intéressante est de savoir pourquoi certains sérums la produisent, tandis que d'autres sont inactifs. Bordet avait déjà fait remarquer que le sang de lapin injecté au cobaye ne produit pas chez cet animal de pouvoir précipitant, tandis que le sang de lapin injecté à des poules donne un résultat positif. J'ai pu observer un fait analogue avec le sérum

de poule, qui provoque si aisément la production du pouvoir précipitant chez le lapin, tandis qu'il ne produit aucune réaction dans l'organisme du pigeon. Ici le résultat pourrait peut-être s'expliquer, en admettant que ce manque de réaction est dû à la grande similitude, peut-être à l'identité des sérums de poule et de pigeon. On sait que Bordet a observé que le sérum actif de lapin, qui précipite le sérum de poule, précipite également celui du pigeon, ce qui, étant donnée la spécificité de ces réactions, parle en faveur d'une grande ressemblance chimique de ces humeurs.

Si ce motif était le vrai, il faudrait qu'il y eût toujours répro-cité de réaction, c'est-à-dire que quand un animal A peut acquérir la propriété de précipiter le sérum d'un autre animal B, celui-ci montrât la même aptitude réactionnelle vis-à-vis du sérum de A. Je n'ai pas eu jusqu'ici l'occasion de m'assurer de ce fait. Cependant il semble probable que d'autres circonstances peuvent intervenir, dues à des teneurs différentes en alcali, en globulines, etc. Avant d'émettre à ce sujet quelque hypothèse, il faudrait connaître mieux l'essence du phénomène et son origine.

Ici encore la même méthode analytique qui m'a servi pour trouver l'origine de la réaction précipitante dans le sang pouvait me fournir de nouveaux renseignements. Le sérum est une solution de différents albuminoïdes, dont les propriétés nous sont en grande partie inconnues, mais où une première séparation peut être obtenue grâce à l'emploi des précipitations par les sels des métaux alcalins ou alcalino-terreux. On distingue une partie facile à précipiter, qui est la globuline; une partie plus soluble, l'albumine. Il est probable que ces deux fractions, la première surtout, sont elles-mêmes des mélanges, dont l'analyse n'a pas donné grand résultat jusqu'aujourd'hui. Il était intéressant de voir si la propriété précipitante s'appliquai indifféremment aux solutions des deux fractions; si, d'autre part, ces solutions injectées séparément pouvaient la faire naître l'une et l'autre. Pour élucider ces questions, je me suis adressé au sérum de cheval qui, injecté au lapin, provoque facilement la propriété précipitante.

La globuline a été séparée de l'albumine par saturation du sérum au moyen de sulfate magnésique à 30°, et le précipité de

globuline purifié par une dissolution suivie de reprécipitation au moyen du même sel ; l'albumine a été obtenue en ajoutant près de 1 0/0 d'acide acétique au filtrat de la précipitation de la globuline, après refroidissement et éloignement de l'excès de sulfate magnésique. Une dialyse de 8 jours dans l'eau chloroformée a débarrassé les solutions de leur excès de sel. Les liquides neutres furent alors additionnés de 1 0/0 de NaCl et stérilisés par le chauffage à 56° pendant huit jours, une demi-heure tous les jours. Leur teneur en globuline ou en albumine fut dosée au polarimètre.

La solution de globuline contenait 2,8 0/0, celle d'albumine 2,6 0/0. Le sérum de cheval contient d'après Hammarsten 7,25 0/0 d'albuminoïdes dont 4,56 de globuline, 2,69 d'albumine.

A un premier lapin A, on injecta 5 fois 5 c. c. de sérum, soit une quantité totale de 1gr,81 d'albuminoïdes dont 1gr,14 de globuline et 0gr,67 d'albumine. Un autre lapin B reçut 5 injections de 15 c. c. de la solution de globuline, soit une quantité totale de 2gr,1 de globuline. Un troisième lapin C reçut en 6 injections 2gr,7 d'albumine. Mélangés avec du sérum de cheval dans le rapport de 2 volumes de sérum actif de lapin pour 1 volume de sérum de cheval, les sérums de A et de B donnèrent des précipitations (plus importantes pour B que pour A), tandis que le sérum de C resta inactif. On pouvait donc conclure que la réaction précipitante est la réponse de l'organisme à l'injection d'une catégorie bien déterminée des substances albuminoïdes du sang, que c'est la globuline seule qui la produit à l'exclusion de l'albumine. Cette constatation a son importance. Elle montre d'abord qu'il faut reconnaître aux deux fractions du sérum une signification physiologique différente, puisque la globuline amène une réaction que ne produit pas l'albumine. D'autre part, le fait que le sérum d'un lapin injecté de globuline (solution datant de plusieurs mois) se comporte vis-à-vis du sérum de cheval comme celui d'un lapin ayant reçu ce sérum complet est la preuve péremptoire, étant donnée la grande sensibilité réactionnelle de ces précipitations, que les manipulations nécessaires pour obtenir la globuline n'ont pas altéré sensiblement sa constitution chimique.

La subtance précipitante du sérum des animaux vaccinés était donc produite par ceux-ci en réponse à l'injection de la

globuline. Quelle était dans le sérum la substance précipitée? Pour cela, il suffisait de faire des mélanges des sérums A, B et C avec les solutions de globuline et d'albumine qu'on avait injectées. C ne donna rien, A et B laissèrent les solutions d'albumine limpides, provoquèrent au contraire dans les solutions de globuline des précipitations au moins aussi importantes que dans le sérum.

Le résultat de ces expériences permettait donc de se rendre compte du phénomène de la précipitation. Dans le sérum de cheval injecté au lapin, c'était la globuline qui avait provoqué chez ce dernier la formation de la substance précipitante. Dans le sérum de cheval précipité par le sérum actif, c'était la globuline qui était la partie précipitée.

Restait à examiner la façon dont se comportait le sérum de ces lapins vis-à-vis des globules rouges du cheval. D'après Tchistovitch, un lapin injecté de sérum de cheval possède un sérum qui, à côté du pouvoir précipitant, possède encore la faculté d'agglutiner et de dissoudre les globules de cheval.

Pour étudier l'agglutination et la globulolyse du sang de poule, de cheval et d'autres animaux, j'ai employé, au lieu de sang défibriné complet, des dilutions de ce sang dans une solution de chlorure sodique à 1 0/0, à peu près isotonique avec le sang de poule, légèrement hypoisotonique vis-à-vis du sang de mammifère. Cette dilution (au 1/10e habituellement) a pour effet de rendre presque complètement incolore le liquide surnageant les globules (ce qui est avantageux dans l'étude de la globulolyse), et de décupler la masse du sang (ce qui permet de réaliser une notable économie de sang et d'animaux). C'est encore pour ce dernier motif que, dans beaucoup d'essais, les quantités de sang dilué examinées ne dépassaient pas 1 c. c.: les observations se faisaient dans de petits tubes à réaction, longs de 8 centimètres, larges de 6 à 7 millimètres. La durée de contact entre sérum et globules était habituellement de 2 heures dans une étuve dont la température variait entre 37° et 40°. Cette durée est très importante à noter dans des expériences quantitatives, et il est absolument nécessaire de prendre à ce sujet une règle constante. Car tant agglutination que globulolyse sont des phénomènes qui, lorsque les solutions de substance active

sont diluées, peuvent se poursuivre pendant des temps souvent très longs. Les propriétés agglutinantes étaient toujours étudiées après chauffage du sérum à 55°, ce qui permet d'éliminer l'action des alexines.

L'agglutination des globules, comme celle des microbes, peut s'observer à l'œil nu et au microscope. En raison de la taille déjà considérable des globules, l'examen à l'œil nu en dit presque autant que l'examen microscopique.

Quand l'agglutination est intense, tous les globules se réunissent rapidement en une coiffe unique occupant le fond du tube, et qui ne se désagrège que par des secousses violentes. Ce degré pourrait être appelé agglutination totale. J'ai toujours, lors de recherches quantitatives, déterminé la quantité minima de sérum provoquant encore cette agglutination totale après 2 heures d'étuve à 37°.

Le sérum de lapin normal est peu ou pas agglutinant vis-à-vis des globules de cheval. Si l'on débarrasse, après centrifugation, les globules de 1 c. c. de sang de cheval dilué au 1/10e du liquide surnageant, et si on remplace celui-ci par 1 c. c. de sérum de lapin, on ne trouve souvent après 2 heures d'étuve aucune agglutination; quelquefois une agglutination partielle.

Au contraire, le sérum de lapin ayant reçu des injections de sérum de cheval (totalement libre de globules) a acquis des propriétés agglutinantes assez nettes. C'est ainsi qu'il suffisait de 0,05 c. c. du sérum du lapin, à qui avaient été faites 5 injections de 5 c.c., pour agglutiner complètement après 2 heures les globules de 1 c. c. de sang de cheval au 1/10e.

Cette augmentation assez considérable du pouvoir agglutinant vis-à-vis des globules de cheval pourrait être due au nouveau constituant du sérum, à la substance précipitante. Et *a priori* on peut imaginer deux façons d'agir de cette substance : ou bien elle amènerait l'agglutination en agissant directement sur les globules, ou bien elle provoquerait dans le sang dilué un précipité extraglobulaire de globuline, qui lors de sa rétraction emprisonnerait et agglomérerait les hématies.

Pour élucider la première hypothèse, il suffisait de provoquer la précipitation de la substance précipitante du sérum actif en lui ajoutant une quantité suffisante de sérum de cheval, de se

débarrasser du précipité par centrifugation, de déterminer la valeur agglutinante du sérum surnageant, et de comparer celle-ci (en tenant compte de la dilution occasionnée par le mélange avec le sérum de cheval) à celle du sérum actif intact. Ces deux valeurs sont identiques. L'agglutinine n'a donc pas été entraînée lors de la précipitation. Elle est donc indépendante de la substance précipitante.

Cette expérience seule suffirait pour écarter également la seconde hypothèse, expliquant l'agglutination des globules par leur emprisonnement dans les mailles du précipité de globuline; ce précipité se produit très rapidement (plus rapidement que dans du sérum privé de globules) quand on ajoute les sérums actifs, même en petite quantité, à du sang de cheval dilué. Dans les tubes, ce précipité forme une coiffe rose, floconneuse, au-dessus des globules; microscopiquement, il se voit nettement sous forme d'agglomérats finement granuleux entourant les amas globulaires.

Cependant les phénomènes sont distincts. Pour s'en convaincre, on débarrasse les globules de leur sérum, on les lave 4 à 5 fois avec du liquide physiologique, et on les met en suspension dans un volume de celui-ci, égal à celui du sérum enlevé. Dans ce liquide, où il n'y a plus trace de précipitation après adjonction de sérum actif, la limite de l'agglutination pour un sérum donné est exactement le même que lorsque la détermination se fait dans le sang dilué.

Si, au lieu de prendre du sérum de lapin injecté de sérum de cheval, on examine le sérum de lapin qui a reçu du plasma de poule, on peut observer également chez lui un léger pouvoir agglutinant vis-à-vis des globules de la poule. Ici aussi, grâce aux mêmes expériences, on démontre facilement que l'*agglutination des globules ne dépend pas de la substance précipitante.*

La valeur du pouvoir agglutinant est toujours faible, nullement comparable à celle du sérum des lapins qui ont reçu des globules de poule. *Elle peut même manquer complètement* dans un sérum dont le pouvoir précipitant est très net.

D'autre part, j'ai pu constater que le sérum d'un lapin injecté de sérum de cheval agglutinait non seulement les globules du cheval, mais aussi ceux de la poule, ce qui indiquerait que les *agglutinines provoquées par l'injection du sérum ne sont pas spéci-*

fiques, à l'encontre de celles que l'on obtient à la suite de l'injection des globules.

Pour toutes ces raisons, il y a lieu de ne pas ajouter d'importance, me semble-t-il, à la faible propriété agglutinante que l'on peut ou non observer dans les humeurs des lapins auxquels on a injecté le sérum de cheval ou le plasma de poule. Très peu développée, n'existant pas dans tous les cas, elle constitue un fait contingent pouvant ou non accompagner la réaction spécifique, qui est l'apparition du pouvoir précipitant.

Il restait à étudier l'action des sérums précipitants sur les globules au point de vue de la globulolyse.

Mes observations ont porté uniquement sur l'action dissolvante du sérum des lapins injectés de plasma de poule.

Pour étudier la globulolyse par les sérums, il faut, plus encore que pour l'agglutination, opérer toujours dans les mêmes conditions. La durée de l'action et la température sont les facteurs dont l'influence est la plus manifeste. L'examen se fait toujours après centrifugation, dont l'action est très rapide sur les dilutions du sang. Comme contrôle, on place dans les mêmes conditions un tube de sang non additionné de sérum. Dans les déterminations du pouvoir globulaire, j'ai toujours pris, pour caractériser un sérum, la limite inférieure de dilution encore active. On a, par exemple, une série de 7 tubes contenant chacun 1 c. c. de sang, additionné respectivement de 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,5, 1 c. c. de sérum actif. Après action du sérum et centrifugation, on trouve que dans le tube 1 le liquide surnageant les globules est parfaitement incolore, que 2 a une teinte jaunâtre, 3 une teinte rosée, tandis que la diffusion de l'hémoglobine est complète à partir du tube 6. Il est préférable, à mon avis, de prendre comme mesure du pouvoir globulolytique la limite inférieure 2 que la limite 6, en raison de la plus grande facilité d'apprécier les différences de teinte entre liquides peu colorés et incolores qu'entre solutions fortement teintées.

Étudié par cette méthode, un même sérum présente une constance absolue de son pouvoir dissolvant, quand on détermine celui-ci dans une série d'opérations simultanées.

Frais de 2 jours, le sérum normal de lapin possède, d'une façon moyenne, un pouvoir dissolvant tel que 0,05 c. c., ajoutés

à 1 c. c. de sang de poule au 1/10ᵉ, déterminent après 2 heures à 37° une légère teinte jaunâtre, indiquant un début de globulolyse. Quand on conserve ce sérum à la température ordinaire et à l'obscurité, il perd graduellement son pouvoir dissolvant, qui est nul après 4 à 6 semaines. Chez quelques lapins normaux, on observe quelquefois un pouvoir dissolvant plus marqué. Il se peut aussi que le traitement qu'on a fait subir à l'animal ait augmenté la teneur en alexine de son sérum. Dans ces cas, il semble que la chute du pouvoir globulicide soit rapide dans les premiers jours, pour tendre plus tard insensiblement vers le zéro.

Comme il a été dit au début de ce travail, la destruction des globules dans le sérum de l'animal normal est dû aux alexines que contient ce sérum ; dans le sérum de l'animal vacciné, elle est le fruit d'une collaboration entre alexines et anticorps. *La vraie caractéristique des humeurs d'un animal immunisé, c'est donc la présence de l'anticorps.* Quand on étudie le sérum d'un animal vacciné, il faut donc toujours, dès que l'on constate une augmentation du pouvoir hémolytique de ses humeurs, déterminer si celle-ci est due à la présence de cet anticorps, ou simplement à une augmentation de la teneur en alexines. On conçoit parfaitement en effet que sous l'influence de certaines vaccinations, ces dernières puissent être déversées en plus grande abondance dans le torrent circulatoire. Et si, comme le pensent la plupart des auteurs, elles sont d'origine leucocytaire, il suffit de penser à l'hyperleucocytose amenée par la plupart des injections vaccinantes pendant les premiers jours qui suivent une vaccination pour comprendre une plus grande richesse en alexines du sérum recueilli à ce moment.

Comme il a été dit, les alexines se détruisent par le chauffage à 56°. Si un sérum doit son activité hémolytique à leur présence uniquement, il perdra toute action après chauffage à cette température. Si, au contraire, le sérum contient, outre l'alexine, l'anticorps, autrement dit la subtance sensibilisante, le chauffage à 56° détruira son alexine, mais laissera intact l'anticorps. Un tel sérum chauffé à 56° et ajouté à du sang de poule ne détruira pas les globules rouges, mais il les sensibilisera. Il suffira d'ajouter au mélange une quantité de sérum frais de lapin telle, qu'à elle seule elle ne puisse pas dissoudre les glo-

bules, pour amener rapidement leur destruction sous l'action combinée de l'anticorps fourni par le sérum actif chauffé et de l'alexine apportée par le sérum normal frais.

Avant chaque examen de ce genre, il faut donc essayer la teneur en alexines du sérum normal frais que l'on emploie. La valeur hémolytique de celui-ci déterminée, on en ajoute au sang une quantité telle, qu'elle ne puisse pas provoquer à elle seule la diffusion de l'hémoglobine. D'autre part, il faut que cette quantité ne soit pas trop inférieure à la quantité suffisante, sous peine de ne pouvoir déceler une faible teneur en anticorps. Pour que ce dernier manifeste son action, quand il est très dilué, il faut que le sang, auquel on l'ajoute, soit déjà, de par l'alexine qui lui a été mélangée, à la limite de la globulolyse.

En suivant cette méthode, on arrive, d'une part, à titrer d'une façon très exacte la teneur d'un sérum frais en alexine; d'autre part à déceler, dans un sérum actif chauffé, de faibles quantités d'anticorps. Voyons ce qu'elle donne au sujet du sérum des lapins ayant reçu du plasma de poule. Comme il a été dit, Tchistovitch et von Dungern croient que les injections de sérum provoquent, tout comme les injections de sang complet, l'apparition ou l'augmentation du pouvoir globulicide vis-à-vis des globules rouges de l'animal dont le sérum a été injecté. Seulement, ils n'ont pas analysé le processus hémolytique et ne disent pas si celui-ci est fonction de l'alexine seule ou de la collaboration entre anticorps et alexine. La question est pourtant d'importance primordiale, puisqu'une hémolyse intense par l'alexine seule ne serait que l'exagération d'un phénomène normal, tandis que l'hémolyse par anticorps et alexine est d'ordre nouveau, spécifique; l'anticorps étant une substance ne préexistant pas dans l'organisme du lapin, et produite par celui-ci pendant la vaccination.

Si l'on examine le sérum frais, non chauffé, d'un lapin qui a reçu le sérum de poule, on constate en effet une augmentation notable de son pouvoir globulicide, qui peut être 4 à 5 fois plus fort que le pouvoir normal.

Si on le chauffe à 56° pendant une demi-heure, et qu'on l'ajoute à doses croissantes à du sang de poule au 1/10e, préalablement additionné d'une quantité telle de sérum normal frais, qu'il y ait une légère globulolyse par le fait de ce dernier seul,

voici ce que l'on constate : on mesure, dans différents tubes, 1 c. c. de sang défibriné de poule au 1/10e ; on ajoute à tous, 0.10 c. c. de sérum normal frais de lapin. Un premier tube, A, ne reçoit pas d'autre adjonction ; B, reçoit en plus 0.1 c. c. du sérum chauffé à examiner ; C, 0,2 ; D, 0,3 ; E, 0,5 ; F, 1 c. c. Après 2 heures à 40°, A est teinté en rose, B également, C déjà moins, et à partir de D il n'y a plus trace de globulolyse. Le sérum chauffé n'a donc aucune action directe sur le phénomène, il a agi comme simple liquide de dilution.

Si, dans une nouvelle expérience, la quantité d'alexine ajoutée est insuffisante pour provoquer seule un début d'hémolyse, il n'y aura de diffusion de l'hémoglobine dans aucun tube. Il suffirait, dans un de ces tubes, d'une infime quantité d'un sérum réellement globulicide, pour y obtenir une belle coloration rouge. La conclusion à tirer de l'expérience, c'est qu'il n'y a pas de trace de l'anticorps spécifique vis-à-vis des globules de poule, chez un lapin qui a reçu le plasma de poule. L'augmentation du pouvoir hémolytique de ce sérum à l'état frais est donc due uniquement aux substances détruites par le chauffage à 56°, c'est-à-dire aux alexines.

Cette teneur plus forte en alexines, détruisant les globules de la poule chez le lapin qui a reçu le plasma de poule, est un phénomène banal. En effet, si au lieu d'injecter du plasma de poule, on administre du sérum de cheval, de la globuline, de l'albumine de cheval, bref des substances n'ayant avec les globules de poule que des rapports très éloignés, on peut constater dans le sérum *frais* de ces lapins une augmentation tout aussi notable du pouvoir hémolytique. Il m'a semblé que la valeur dissolvante dépendait plus de la date de la prise du sang que de la nature de la substance injectée. Si la prise suit de près une injection, on a chance d'avoir un sérum plus actif.

Il en est donc du pouvoir dissolvant comme du pouvoir agglutinant. A ce double point de vue, les lapins injectés de plasma de poule fournissent un sérum qui, relativement aux globules rouges de poule, se comporte comme un sérum normal légèrement exalté dans ses propriétés primitives. Cette double exaltation n'est nullement spécifique, puisque l'injection du sérum de cheval la produit également, et elle peut être rapportée, d'une façon certaine en ce qui concerne l'hémolyse, d'une

façon probable en ce qui concerne l'agglutination, à une richesse plus grande en alexines (les alexines chauffées à 56° déterminant peut-être de l'agglutination).

D'autre part, cette exaltation est inconstante, n'est pas en rapport avec le degré de vaccination, peut manquer totalement. La seule réaction spécifique, quand on injecte le sérum ou le plasma du cheval, du chien, de la poule, c'est l'apparition d'une nouvelle propriété ; la propriété précipitante qui, provoquée par le sérum, s'adresse au sérum.

Quand donc, à la suite de l'injection de sang défibriné de poule, Bordet a obtenu chez ses lapins, outre le pouvoir précipitant, la production d'agglutinines et d'anticorps *spécifiques*, c'est uniquement aux globules injectés qu'il faut attribuer la faculté de produire ces nouvelles substances. Cette conclusion, à laquelle mènent indirectement les expériences faites avec le sérum des lapins injectés de sérum, se confirme par l'étude des humeurs d'autres animaux, auxquels on a injecté les globules, débarrassés de toute trace de sérum.

Le pouvoir agglutinant et globulicide de ceux-ci, comparé à celui d'animaux ayant reçu les quantités correspondantes de sang complet se montre tout aussi actif que celui de ces derniers.

II

Quand donc on injecte à un animal les globules rouges du sang d'une autre espèce animale, débarrassés de toute trace de sérum, on provoque l'apparition d'agglutinines et d'anticorps spécifiques.

Cependant, d'après les recherches d'Ehrlich et Morgenroth, le pouvoir agglutinant ferait défaut chez les chèvres injectées de sang de mouton. D'autre part, Landsteiner signale une prédominance du pouvoir agglutinant sur le pouvoir globulicide chez les lapins injectés de sang de cheval et de chien.

Il semble qu'on puisse admettre que les deux propriétés ne sont pas le fait d'une même substance, puisque l'une ou l'autre peut disparaître ou être très réduite. Cependant on pour-

rait objecter à pareil raisonnement que l'agglutinine peut exister sans qu'il y ait agglutination (puisque, comme l'a démontré Bordet, la constitution du liquide ambiant intervient dans la production du phénomène), et que, d'autre part, il peut y avoir anticorps, mais non globulolyse, si dans le même sérum il n'y a pas aussi l'alexine appropriée. Et dès lors, tout se trouve remis en question. De fait, dans les travaux précités, la question n'a pas été discutée à ce point de vue, et de nouvelles recherches étaient nécessaires.

J'arrivai à un résultat d'une façon indirecte. Ayant cherché à étudier l'influence de l'injection du sang d'un animal, à un autre dont le sérum est complètement dépourvu d'activité vis-à-vis du premier, je m'étais adressé au pigeon, auquel j'injectai des globules de poule. J'avais choisi cet animal, parce que Bordet avait montré que le sérum des lapins vaccinés contre le sang de poule précipite le sérum de pigeon tout aussi bien que le sérum de poule, ce qui, étant donnée la délicatesse de ces réactions, plaidait en faveur d'une grande ressemblance chimique de ces deux milieux. En effet, le sérum de pigeon normal semble conserver aussi bien les globules de la poule que le sérum de ce dernier animal.

Quand, à un pigeon, on injecte à différentes reprises du sang de poule, le sérum de ce pigeon devient actif. Un pigeon qui avait reçu 5 injections de 5 c. c. de sang donna un sérum dont 0,05 c. c. provoquaient l'agglutination complète de 4 c. c. de sang défibriné de poule au 1/10e. Ce sérum frais ne dissolvait pas plus les globules de poule que le sérum de pigeon normal. Jusqu'ici tout était conforme aux prévisions. Il n'y avait pas globulolyse, faute d'alexines. Pour mettre les anticorps en évidence, il fallait ajouter en outre un sérum normal fournissant les alexines, celui du lapin par exemple. Mais dans un mélange contenant celles-ci en quantité suffisante, le sérum actif de pigeon ne détermina aucune globulolyse, ce qui ne se conçoit qu'en le supposant dépourvu de tout anticorps. La dissociation des deux phénomènes était complète et inverse de celle observée par Ehrlich et Morgenroth.

Il faut donc bien admettre que les deux propriétés ne sont pas fonction d'une même substance, mais appartiennent à des albuminoïdes différentes.

Car si la même substance était à la fois agglutinante et dissolvante, le fait qu'elle a agglutiné les globules prouve qu'elle est entrée en combinaison avec eux, et dès lors ces globules agglutinés devraient être également sensibilisés vis-à-vis des alexines.

En ce qui concerne les microbes, on est arrivé également à la dissociation des deux propriétés, et Gengou, un élève de Malvoz, a pu obtenir, par l'injection à des chiens du vaccin I du charbon, un sérum très agglutinant, sans qu'il présentât des traces de pouvoir bactéricide. Cependant on pourrait objecter dans ce cas que, en raison de l'absence totale dans le sérum de chien d'alexines actives sur le charbon constatés par Gengou, des anticorps réellement existants n'ont pu produire leur effet. Il eût été intéressant d'activer le mélange en y ajoutant du sérum frais, de rat, par exemple.

Cette dissociation des deux phénomènes, que le sérum du pigeon effectue d'une façon aussi complète, peut encore s'obtenir, moins complète il est vrai, d'une autre manière.

Mais examinons d'abord ce qui se passe chez le lapin auquel on injecte des globules de poule. Comme on le sait, ce traitement rend le sérum du lapin très agglutinant, et augmente notablement son pouvoir globulicide. Ici, cette augmentation du pouvoir globulicide est due, en partie au moins, à la présence dans ce sérum d'un anticorps spécifique. Il suffit, pour le prouver, de chauffer ce sérum à 56°, pendant une demi-heure, pour détruire les alexines, et d'en ajouter de faibles quantités à du sang défibriné de poule, préalablement muni d'une dose insuffisante par elle-même de sérum frais, mais se trouvant à la limite d'action. On obtient dans ces conditions, après 2 heures d'étuve, pour des quantités très faibles de sérum actif, la diffusion souvent intégrale de l'hémoglobine. A côté de la présence dans ce sérum d'un anticorps spécifique, il peut y avoir un autre facteur qui tend à augmenter son pouvoir dissolvant, quand il est frais. C'est l'augmentation de la quantité d'alexines. Comme il a été montré plus haut, il y a lieu d'admettre que ces dernières apparaissent en plus grande abondance dans les humeurs d'un animal, quand on injecte à ce dernier des albuminoïdes divers. Si l'on examine le sérum du lapin qui a reçu des globules de poule à l'état frais, et si on détermine son pouvoir hémolytique propre (sans

adjonction de sérum normal) immédiatement après la prise de sang, puis à différents intervalles, on constate que le pouvoir dissolvant, d'abord notable, diminue lentement pour devenir nul après un mois environ. Il suffit à ce moment de le mélanger avec la quantité nécessaire de sérum frais d'un lapin normal pour la réactiver complètement. Si, immédiatement après avoir recueilli ce sérum, on détruit dans une partie de celui-ci les alexines par le chauffage, on peut, en ajoutant à une quantité donnée de ce sérum chauffé des quantités croissantes de sérum normal, et en comparant ce qu'il faut ajouter de ce dernier pour avoir le même effet dissolvant que celui obtenu par le sérum actif frais isolé, déterminer la teneur en alexines de ce dernier. Une expérience fera mieux saisir le raisonnement.

Comme il a été dit, la dose habituelle de sérum de lapin normal (S. n.), qui produit un début de globulolyse dans du sang de poule dilué au 1/10, est de 0,05 c. c. de sérum par centimètre cube de sang, après 2 heures à 37°. Au contraire, le sérum d'un lapin qui a reçu les globules (S. gl.) pourra encore produire à l'état frais une hémolyse assez forte à raison de 0,05 c. c. pour 5 c. c. de sang.

Pour obtenir la même teinte dans 5 c. c. de sang additionnés de 0,05 c. c. de S. gl. chauffé, il faudra ajouter, par exemple, 0,1 ou 0,15 c. c. de S. n. D'où la conclusion que dans 0,05 c. c. de S. gl. frais, il y a, outre l'anticorps, une quantité d'alexine correspondant à celle de 0,1 ou 0,15 de S. n.

La vaccination, en même temps qu'elle produit l'anticorps, augmente la quantité d'alexine. Y a-t-il parallélisme entre les deux phénomènes? L'expérience répond négativement.

Comme il a été dit précédemment, pour que l'anticorps exerce complètement son action, il faut que le sang auquel on l'ajoute soit, de par sa teneur en alexines, à la limite de la globulolyse; c'est alors que l'anticorps donne son effet maximum. Si l'on diminue légèrement la quantité des alexines, la dissolution est beaucoup moins complète. On peut cependant rétablir le niveau en augmentant la quantité d'anticorps. Seulement ce balancement ne peut s'effectuer qu'entre des limites très étroites, et, chez le lapin, il semble, dans les conditions de mes expériences, que la quantité d'alexines ne pouvait pas être diminuée au delà du 1/3 ou du 1/4 de la dose limite, sous peine de voir disparaître toute dissolution

globulaire, quelles que fussent l'activité du sérum spécifique et la quantité de ce dernier.

Pour que le parallélisme entre production d'anticorps et d'alexines se maintînt, il faudrait donc qu'à mesure que le lapin produise les premiers, il augmente sa provision des secondes, de manière à assurer toujours aux premiers leur effet maximum. Ce parallélisme est un postulat de la théorie d'Ehrlich sur la formation et la signification des anticorps et des alexines. Or, dans l'exemple précité, la quantité des alexines de S. gl. frais est égale à 2 ou 3 fois celle du S. n., et le pouvoir globulicide total du S. gl. frais, environ 5 fois plus grand que celui du S. n. Si maintenant on détermine le pouvoir sensibilisant du S. gl. chauffé, on trouve que 0,05 c. c. de ce sérum, ajoutés à 20-30 c. c. de sang ou davantage, préalablement additionnés de la quantité suffisante de S. n. frais (1 et 1,5 c. c.), déterminent encore une forte destruction globulaire dans ce mélange, qui, sans l'adjonction du S. gl., serait resté incolore. La limite d'action de S. gl. est donc bien plus reculée, quand on lui fournit la quantité suffisante d'alexines, que ne le feraient croire les mensurations opérées avec le sérum frais.

La même quantité d'anticorps produit, dans les deux expériences, la dissolution des globules de 5 c. c. de sang, ou de plus de 30 c. c., suivant la quantité d'alexines mises à sa disposition.

Dans le S. gl. frais, la teneur en alexines était 2 à 3 fois plus considérable que dans le S. n. frais. Dans l'expérience faite avec le S. gl. chauffé, elle était 30 fois plus considérable, et la limite d'action du S. gl. chauffé n'était pas atteinte. Il faudrait donc, pour que l'anticorps contenu dans le S. gl. frais puisse fournir son effet maximum, que la quantité d'alexines dépassât 30 fois la quantité normale, et elle est égale à 2 à 3 fois celle-ci. On est donc en droit de conclure que *la production de l'anticorps se poursuit dans l'organisme du lapin d'une façon indépendante de l'augmentation des alexines*. Il semble que les albuminoïdes du sérum, plus que les constituants globulaires, soient des stimulants de la formation de celles-ci, puisque, chez les animaux injectés de plasma de poule et de sérum de cheval, la teneur en alexines fut trouvée souvent égale à 5 fois la teneur normale.

Il suffit d'une seule injection des globules provenant de

10 c. c. de sang de poule, pour rendre actif le sérum d'un lapin vis-à-vis des globules rouges de la poule. L'anticorps et l'agglutinine semblent se former en même temps. Chez un lapin examiné à cet effet, ils existaient tous deux à l'état de traces le 3e jour après l'injection. C'est du 8e au 10e jour, semble-t-il, qu'ils atteignent leur maximum. Je n'ai d'ailleurs pas fait d'étude systématique à ce sujet.

La puissance agglutinante et dissolvante du sérum d'un lapin qui n'a reçu qu'une seule dose est assez faible. Elle s'accroît notablement par l'effet d'injections répétées.

Pour arriver à dissocier agglutination et dissolution, je fis à des lapins l'injection séparée des deux produits que nous fournit l'action de l'eau distillée sur le globule du sang de poule. L'eau distillée ne produit pas une dissociation chimique. Elle détruit un équilibre osmotique. Le globule rouge pouvant être considéré schématiquement comme constituant une vésicule close, remplie d'un liquide cellulaire chargé d'hémoglobine, l'eau, en provoquant la rupture de la vésicule, sépare le contenu du contenant. En injectant à des lapins la solution rouge, je leur injecte le suc cellulaire; en leur injectant les stromas, j'introduis dans leur organisme la paroi protoplasmatique cellulaire. C'est ce qu'avait déjà essayé von Dungern, qui n'avait rien vu se produire, quand il injectait les constituants isolés, et avait observé l'apparition du pouvoir agglutinant seul, sous l'influence de l'injection du mélange. Seulement von Dungern ne faisait qu'une seule injection, et si cela suffit, quand on injecte les globules, cela peut parfaitement être insuffisant quand on en injecte les constituants, surtout si ces constituants, comme l'hémoglobine, se trouvent maintenant à l'état dissous et, partant, dans des conditions d'absorption différentes.

Pour provoquer la dissociation des globules, on commence par les laver au liquide physiologique, de façon à les débarrasser de sérum; puis après centrifugation et décantation des liquides de lavage, on ajoute par petites portions de l'eau distillée, en agitant fortement, de façon à éviter le plus possible la formation de grumeaux, qui englobent les globules restants et les protègent contre l'action de l'eau distillée.

J'ajoutais habituellement un volume d'eau égal à 3 ou 4 fois

le volume de sang d'où provenaient les globules. Ceux-ci sont alors complètement dissociés, à part quelques grumeaux dont le centre reste coloré et le restera malgré une action prolongée de l'eau distillée. Ils forment, dans le liquide rouge, un amas visqueux, coloré en rouge, qu'il est impossible de débarrasser des dernières traces d'hémoglobine par des lavages à l'eau distillée. Au contraire, par un moyen simple, que je n'ai malheureusement employé que vers la fin de mes recherches, on arrive facilement à une extraction presque complète. Il suffit d'ajouter, au liquide de dissociation, du chlorure sodique en quantité telle que la teneur du mélange soit de 1 0/0.

Si l'on centrifuge, les globules se réuniront très facilement dans le fond des tubes et on les épuisera complètement par 2 ou 3 nouveaux lavages à la solution physiologique. Cela, à condition d'avoir bien agité lors de la dissociation, de façon à éviter la formation de grumeaux épais. En secouant vivement, on peut mettre ces stromas, agglomérés entre eux et complètement blancs, en suspension dans le sérum artificiel, et les injecter à travers une grosse aiguille de seringue dans le péritoine d'un lapin. Quant à la solution rouge qui surnageait, on l'injecte telle quelle à un autre animal, après l'avoir soigneusement débarrassée par une centrifugation prolongée des stromas isolés qui y sont suspendus.

Si l'on fait à deux animaux l'injection des produits provenant de 10 c. c. de sang de poule, et qu'on examine leur sérum après une huitaine de jours, on ne constate chez celui qui a reçu la solution d'hémoglobine rien d'appréciable, à part une légère augmentation du pouvoir globulolytique, dû entièrement à des alexines. Le sérum du lapin qui a reçu les stromas a acquis la propriété d'agglutiner, à doses assez fortes d'ailleurs, les globules de la poule. Chez lui non plus, pas de traces d'anticorps. Si l'on continue les injections, les résultats deviennent très intéressants. Le sérum du lapin vacciné au moyen des stromas accentue son pouvoir agglutinant, et celui-ci atteint des valeurs assez élevées, moindres cependant que celles que provoquent les globules intacts. Les valeurs obtenues pour des animaux ayant reçu les stromas lavés des globules sont 2 à 3 fois moindres que si on leur avait administré les globules intacts. Il faut d'ailleurs faire la part des variations individuelles, et aussi des pertes

de matière pendant les manipulations. D'autre part, il est possible et même probable que la désintégration globulaire amène la dissolution partielle du stroma, tous facteurs tendant à diminuer la valeur du pouvoir agglutinant chez l'animal auquel ils sont injectés. Si, malgré ces conditions défavorables, les différences ne sont pas plus fortes, on peut légitimement en conclure que, lors de la formation de l'agglutinine, la seule partie du globule qui intervient, c'est le stroma. Cette manière de voir est encore légitimée par l'étude du sérum du lapin témoin qui a reçu l'hémoglobine. Ce dernier, après 5 ou 6 injections, présente un pouvoir agglutinant presque nul; 1 c. c. d'un tel sérum n'arrivait pas à agglutiner complètement les globules de 1 c. c. de sang de poule au 1/10. Comparé à ce point de vue au sérum du lapin qui a reçu exactement la quantité équivalente de stromas, sérum dont 0,05 c. c. provoquaient l'agglomération complète des globules de 5 c. c. de sang, la valeur agglutinante se trouve être plus de 20 fois moindre. Et cependant la masse des albuminoïdes globulaires injectée est près de 2 fois plus considérable : d'après des chiffres d'analyse du sang d'oie, l'hémoglobine représente environ les 2/3 en poids du résidu sec du globule. Ce vestige de propriétés agglutinantes que l'on rencontre chez le second lapin est probablement dû à la petite quantité de stromas qui passe en dissolution lors de la destruction des globules.

La comparaison des deux sérums, au point de vue de la valeur globulicide, est tout aussi intéressante. Tous deux possèdent une certaine quantité d'anticorps, mais celle-ci est incomparablement plus forte dans le sérum du lapin qui a reçu le suc cellulaire (S. h.) que dans l'autre (S. str). Pour s'en assurer, il suffit de les ajouter l'un et l'autre à des quantités croissantes de sang additionné de la quantité suffisante d'alexine. La limite, dans une détermination de ce genre, fut de 0,05 c. c. de S. str. pour 9 c. c. de sang, tandis que la valeur de la même quantité 0,05 c. c. de S. h. ne put être déterminée, vu qu'elle dépassait largement 20 c. c.

Il existe un meilleur moyen de mettre ces différences en relief. Il est basé sur les propriétés que possèdent les globules, de fixer anticorps et agglutinine. On fait une dilution au 1/5 des deux sérums dans du liquide physiologique. On prend par

exemple 5 c. c. de chacune de ces dilutions et on y ajoute les globules privés de sérum de 1 c. c. de sang de poule au 1/10. On laisse à l'étuve pendant 2 heures ; on voit s'il y a agglutination, et on sépare globules et sérum. Ce dernier est remis sur de nouveaux globules et traité comme devant. On peut ainsi arriver à débarrasser par fractions un sérum de ses constituants actifs. Si maintenant on place les globules ainsi traités dans du liquide physiologique additionné d'une quantité suffisante d'alexine, on peut savoir s'ils se sont imprégnés ou non d'anticorps. Quand les globules sont agglutinés, il faut évidemment, en secouant énergiquement, dissocier l'agglomérat de façon à permettre le contact de l'alexine sur tous les éléments.

Au point de vue de l'agglutination, voici ce qui se passait avec les deux sérums précités. Dans le S. h., il y a trace d'agglutination au premier passage, puis plus rien. Pour le S. str., il a fallu 6-7 passages pour débarrasser les 5 c. c. (qui représentent 1 c. c. de sérum) de leur agglutinine.

En ce qui concerne le pouvoir globulicide, les globules traités par le S. str. se dissolvent dans l'alexine aussi longtemps qu'ils sont agglutinés ; on pourrait donc en conclure qu'il y a dans S. str. juste assez d'anticorps pour en saturer les globules agglutinés. Mais il y a ici une cause d'erreur, les globules agglutinés sont en effet devenus extrêmement fragiles. Si, au lieu de les placer dans l'eau salée additionnée d'alexine, on les place dans de l'eau salée pure, ils perdent ainsi leur hémoglobine, même à 0° (après un temps suffisamment long). D'où l'impossibilité de déterminer de cette façon la valeur exacte de S. str. au point de vue de sa teneur en anticorps. Mais dès qu'il n'y a plus agglutination, les globules traités par S. str. ne se dissolvent plus dans l'eau salée additionnée de sérum normal frais, d'où au moins la possibilité de dire qu'à ce moment il n'y a sûrement plus d'anticorps dans la dilution au 1/5 de S. str. Ce qui peut d'ailleurs se démontrer directement en mettant les globules dans la dilution de S. str. même, en leur ajoutant la quantité suffisante de sérum normal. Il n'y a pas de traces de globulolyse après 2 heures d'étuve. Il a donc suffi de 6-7 passages pour rendre ce sérum tout à fait inactif aux deux points de vue. Au contraire, après 6 et 8 passages, le S. h. est toujours actif, malgré l'imprégnation des globules lors de

chaque passage. Une détermination de son activité après 6 passages par la méthode précédente donna le résultat suivant : 0,25 c. c. (correspondant à 0,05 c. c. de sérum pur) coloraient encore en rouge vif 10 c. c. de sang de poule au 1/10, pourvus de sérum normal, c'est-à-dire que ce sérum ainsi appauvri était encore plus riche en anticorps que le S. str. neuf.

Il n'y a donc aucun doute possible sur le résultat. *L'injection des stromas globulaires produit l'apparition du pouvoir agglutinant : l'injection du contenu globulaire produit l'apparition du pouvoir globulicide.* Dans les deux cas, à côté du produit principal, existe en petite quantité le produit accessoire, mais les déterminations quantitatives dénotent une énorme prédominance de la substance agglutinante chez les animaux injectés de stromas, de l'anticorps chez ceux qui ont reçu l'hémoglobine.

En ce qui concerne ces derniers, la propriété agglutinante a pu être réduite presque à rien, ce qui provient de ce qu'il est plus facile de préparer des solutions d'hémoglobine complètement libres de débris cellulaires, que d'obtenir des stromas totalement dépourvus d'hémoglobine. Comme je l'ai dit plus haut, je ne suis arrivé à débarrasser complètement les stromas de leur hémoglobine que récemment : les animaux dont j'ai examiné le sérum ont reçu, du moins au début de leur vaccination, des stromas globulaires assez fortement teintés. Peut-être pourrait-on obtenir, en s'appliquant à n'injecter que des stromas tout à fait blancs, un sérum strictement agglutinant. J'ai jugé les résultats précédents assez démonstratifs par eux-mêmes, pour permettre d'en tirer les conclusions précédentes.

Il faut également être mis en garde contre le fait, cité plus haut, que des globules fortement agglutinés deviennent très délicats. L'imprégnation de leur enveloppe par l'agglutinine semble transformer la perméabilité de celle-ci, et le globule perd son contenu même à froid dans des solutions isotoniques de chlorure sodique. Le sérum de lapin ayant reçu du plasma de poule semble agir de la même façon, mais à un moindre degré cependant. Au contraire, le sérum d'animaux injectés d'hémoglobine n'a pas montré cette propriété. La constatation a son importance. Elle prémunit contre l'erreur qui consisterait à mettre sur le compte de l'alexine ou de l'anticorps ce qui est le

fait de l'agglutinine même. D'autre part, elle indiquerait que, dans certains cas tout au moins, cette imprégnation peut, quand elle est intense, constituer pour la cellule agglutinée une lésion grave. Or, d'après les idées courantes, l'agglutination n'aurait aucune influence défavorable sur la cellule. Si cependant on admet qu'elle est la conséquence d'une imprégnation par l'agglutinine du protoplasme cellulaire pariétal, on conçoit que cette modification de l'enveloppe cellulaire puisse modifier aussi la perméabilité de celle-ci, transformation de la plus haute importance au point de vue de la vie de la cellule.

Dans les expériences précédentes, tout se passe comme si, lors de l'agglutination d'une émulsion de cellules, l'agglutinine contenue dans le sérum se fixait sur les cellules. C'est l'opinion généralement admise.

Cependant Duclaux (10) a émis l'hypothèse que l'agglutinine pourrait bien agir à la façon d'une enzyme coagulante, qui, en déterminant à la surface des éléments suspendus dans un liquide, la coagulation d'une substance dissoute dans ce dernier, provoquerait l'agglomération des particules suspendues. Si telle était la nature du phénomène, l'inactivité du sérum obtenu par adjonction successive de globules ne résulterait pas de la fixation de l'agglutinine sur les globules, mais serait la conséquence de l'accumulation dans le sérum de produits dus à l'action de l'enzyme. On sait en effet que lors de toute fermentation due à des ferments solubles ou enzymes, l'accumulation des produits mêmes de la fermentation arrête le phénomène dès qu'elle atteint un certain niveau.

A priori, on pourrait faire, en ce qui concerne l'agglutination, diverses objections à cette manière de voir. Mais dans ces domaines peu connus, l'expérience directe vaut mieux que le raisonnement. Or une expérience simple permet de se faire une opinion à ce sujet. Si l'on prend un sérum privé de ses agglutinines par la méthode précitée, on se trouve, suivant que l'on admet l'une ou l'autre opinion, en présence, ou d'un liquide totalement indifférent (dans l'hypothèse de la fixation de l'agglutinine sur la cellule), ou d'un milieu contenant des agglutinines et certains produits empêchants dus à l'activité de ces dernières (hypothèse de l'enzyme). Si dans ce milieu on ajoute des globules, et qu'on y détermine, en même temps que

dans une dilution sanguine (contenant exactement la même quantité de globules), le titre agglutinatif d'un sérum agglutinant, on trouve dans les deux séries, ou bien exactement la même limite, ou une agglutination légèrement plus forte dans le sérum que dans le sang. Le sérum neutralisé ne montre donc aucune action empêchante. Il ne peut évidemment être question de dilution des produits empêchants, puisque la masse du sérum actif ajouté ne dépassait pas, dans les expériences, la 1/20e partie de la masse totale du liquide. Il faut donc bien admettre que lorsque, par suite d'agglutination, un sérum devient inactif, c'est bien parce que la partie active de ce sérum, l'agglutinine, est fixée sur la cellule agglutinée.

Dans quels rapports de masse se fait cette fixation? Une détermination directe n'est évidemment pas possible. Mais on peut rendre probable la constance de cette combinaison dans des conditions bien déterminées, en faisant des essais comparatifs avec la même agglutinine que l'on ajoute à doses croissantes à des volumes égaux de diverses dilutions de sang. Si, par exemple, on prépare une série de tubes de 1 c. c. de sang défibriné de poule; que l'on détermine la limite d'agglutination en ajoutant aux différents tubes des doses croissantes de sérum; que l'on fasse une deuxième série où le même sang a été dilué de 1/2, puis d'autres où la dilution est de 1/5, 1/10, 1/20, et qu'on établisse quelle est la quantité du même sérum qui provoque l'agglutination totale de ces dilutions, on trouve invariablement que, plus il y a de globules, plus il faut de sérum. De plus, dans beaucoup d'essais, il y a une proportionnalité stricte entre la dilution du sang et la quantité de sérum à employer. C'est ainsi qu'un sérum provoquait l'agglutination totale d'une dilution de sang à 1/2, à la dose de 0,5 c. c. par centimètre cube, et que, pour le même sérum, la limite d'agglutination totale pour le sang au 1/20 était 0,05 c. c., exactement 10 fois moins.

J'ai pu obtenir, dans d'autres déterminations, des résultats aussi concordants. Il semble donc que, pour des conditions d'expérience déterminées, *il y ait un rapport constant de poids entre agglutinine et substance agglutinée.*

Au point de vue de la mesure du pouvoir agglutinant, il n'est donc pas indifférent d'employer une plus ou moins grande quantité de cellules. Et l'importance de la richesse de l'émul-

sion est évidemment aussi grande en valeur relative, qu'il s'agisse de microbes ou de globules. Seulement, étant donné le titre agglutinatif très élevé d'un sérum microbien, une différence dans la richesse d'émulsion de 1 à 2 pourra causer un écart de titre de 1/50,000 à 1/100,000 par exemple. Tandis que pour les globules cette même différence se fera sentir dans les dixièmes. D'ailleurs, il est probable que, si le titre agglutinatif ne s'élève jamais très haut dans l'agglutination des globules, tandis qu'il atteint des valeurs énormes quand il s'agit de microbes, la cause principale de cette différence est à chercher dans la différence de poids de matière à agglutiner dans les deux émulsions. Autant l'agglutination des microbes dépasse l'agglomération des globules, autant la masse de ceux-ci est forte vis-à-vis de l'infime poids des premiers. Tous les titres d'agglutination déterminés avec des quantités de matières agglutinées inconnues n'ont donc aucune valeur absolue. Ils ne peuvent présenter qu'un intérêt relatif, résultant de leur comparaison avec d'autres résultats, acquis dans des conditions constantes.

On a beaucoup discuté au sujet de la nature de l'agglutination. Pour Grüber (11), Nicolle (12), l'agglutinine rend visqueuse l'enveloppe microbienne et provoque de cette façon l'accollement des germes. Comme on l'a vu plus haut, Duclaux suppose qu'il y a coagulation ou dépôt, à la surface du microbe, d'une substance préalablement dissoute dans le liquide ambiant. Les microbes porteurs de leur gangue de substance coagulée se trouvent maintenant dans de nouvelles conditions d'équilibre vis-à-vis du liquide, d'où peut résulter, pour certaines compositions de ce dernier, une agglomération des particules. Le phénomène, comme on le voit, serait l'analogue de la coagulation du lait, telle que la conçoit Duclaux. Bordet défend à peu près la même idée : pour lui, le phénomène initial, c'est la fixation de l'agglutinine par le microbe, d'où résulte une modification des propriétés de l'enveloppe microbienne, partant de ses rapports d'équilibre avec le liquide ambiant. Les opinions des deux derniers auteurs admettent donc deux phases distinctes dans le phénomène : 1° une phase de coagulation, extracellulaire pour Duclaux, intracellulaire pour Bordet : 2° une phase d'agglomération des particules coagulées.

Ces deux temps de l'agglutination peuvent être réalisés isolément, ainsi qu'il résulte d'une expérience de Bordet. Si l'on agite dans de l'eau distillée des amas de microbes agglutinés, bien lavés à l'eau distillée, les amas désagrégés ne se reforment plus. Pour qu'il y ait de nouveau agglomération, il suffit d'ajouter du chlorure sodique jusqu'à concurrence de 6 0/0. Comme le fait ressortir Bordet, l'expérience rappelle totalement celles que l'on fait en physique sur les matières colloïdales. D'où la conclusion que les microbes qui ont subi l'action de l'agglutinine se trouvent placés dans des conditions d'équilibre, avec le liquide qui les baigne, semblables à celle des matières colloïdales dans leurs pseudo-solutions. Si, dans ce liquide, la teneur en sels ou en autres principes dissous est telle que la pseudo-solution n'est pas possible, il y a rupture d'équilibre et agglomération. Pour qu'il y ait agglutination des cellules, il faut donc deux conditions : 1° mettre l'enveloppe cellulaire dans un état semblable à celui qui caractérise les matières colloïdales; 2° réaliser une composition du liquide ambiant telle que les matières colloïdales formées lors de la première phase ne puissent y rester en suspension.

Cette manière de concevoir l'agglutination a sur la première le grand avantage de mettre une formule générale pouvant embrasser un grand nombre de faits, de nature à première vue différente, là où la première ne met en réalité qu'un mot, une épithète dont la signification, le contenu sont une donnée directe de nos sens. Visqueux est le mot propre de ces matières qui collent à tout ce qu'elles atteignent. La glu en est un bon exemple. Or rien ne nous prouve que les cellules agglutinées soient nécessairement gluantes. Grüber lui-même, ayant mélangé à une culture microbienne qu'il allait agglutiner des germes d'une autre espèce et des particules microscopiques de nature variée, constatait que, lors de l'agglutination, la plupart des particules et des germes étrangers restaient libres. Jamais ni globules ni microbes agglutinés ne collent au vase qui les contient. Si les cellules agglutinées étaient réellement visqueuses, on concevrait difficilement que cette viscosité s'adressât uniquement à des éléments de même espèce. L'idée, purement empirique, que nous nous formons de la viscosité en recevrait une limitation singulière que rien n'autorise.

Il est donc préférable de concevoir l'agglutination comme étant le fait d'une transformation colloïdale de la couche corticale des cellules, d'une gélification, pourrait-on dire, pour employer un mot qui ne présume rien, suivie d'une agglomération des cellules gélifiées.

Cette gélification peut résulter de beaucoup d'influences. Malvoz (13), qui a fait une étude approfondie de l'agglutination par les substances chimiques, énumère une longue liste de corps chimiquement bien définis, dont l'action sur un grand nombre d'espèces microbiennes produit leur agglutination. Or, si l'on examine les nombreuses substances chimiques, dont il a vérifié le pouvoir agglutinant, on leur trouve une qualité commune, leur action précipitante ou altérante sur les albuminoïdes. Quand on les mélange à une émulsion de cellules, ils exercent évidemment cette action sur la paroi de celles-ci. Au point de vue chimique, les transformations qui en résultent sont nécessairement différentes, étant donnée la dissemblance des réactifs. Suivant la nature de ceux-ci, elle pourra être nettement chimique (ce sera le cas pour les aldéhydes, les sels des métaux lourds), ou se rattacher à ces phénomènes limites, phénomènes d'absorption, d'affinité mecanique (Ostwald), comme dans l'agglutination par les colorants d'aniline. Mais dans toutes ces réactions le produit pourra posséder, outre ses caractères chimiques, une propriété commune, l'état colloïdal, et ce dernier seul importe au point de vue de l'agglutination.

En raison de l'aptitude générale que présentent les différents agents chimiques, d'entrer en réaction avec les diverses protéides cellulaires, il ne faut pas s'attendre à beaucoup de spécificité dans les phénomènes d'agglutination qu'ils produisent. Cette spécificité apparaîtra dans l'agglutination dès que les réactifs agglutinants déploieront une activité moins brutale, moins générale. C'est le cas pour l'agglutination par les sérums normaux. Ceux-ci contiennent des albuminoïdes, qui pénètrent la paroi de certaines cellules (l'action des alexines nous en fournit un exemple). On conçoit que dans beaucoup de cas, où la transformation résultant de cette pénétration n'est pas assez profonde pour amener la mort de la cellule, elle soit cependant suffisante pour déterminer l'agglutination.

Dans l'action des sérums obtenus par vaccination, la spéci-

ficité devient absolue ou presque absolue. De plus, les autres conditions du phénomène, déterminées par les expériences précédentes, permettent un commencement d'analyse de celui-ci. Il a été prouvé que l'agglutinine était réellement fixée sur le globule, et que, en des temps égaux, il faut dix fois plus d'agglutinine pour dix fois plus de globules. Ces constatations semblent plaider en faveur d'une conception chimique du phénomène. Cependant il faut bien avouer qu'ils s'accorderaient tout autant avec l'hypothèse que les affinités mises en jeu sont moins d'ordre atomique que d'ordre moléculaire, qu'il s'agirait en un mot de phénomènes de teinture.

Et dans ces conditions, l'agglutination spécifique serait ramenée, quant à son essence intime, aux agglutinations par les colorants et les sérums normaux. La seule caractéristique consisterait en l'origine spéciale et la spécificité plus grande de l'agglutinine vaccinale.

Je crois avoir démontré que lors de l'injection des globules de poule dans l'organisme du lapin, seule leur paroi protoplasmique était active en ce qui concerne la production des agglutinines. Or dans l'agglutination c'est cette même paroi protoplasmique qui est la partie transformée, la partie gélifiée. On observe ici un fait de même ordre que celui qui a été mis en lumière lors de l'injection séparée de la globuline et de l'albumine du sérum de cheval; fait moins intéressant au point de vue de l'agglutination, en elle-même, qu'à un point de vue plus général. De même que, dans le sérum, c'était la globuline qui provoquait la formation de la substance précipitante, et qui était précipitée par celle-ci, de même, dans les globules, c'est la paroi vésiculaire dont l'injection est l'origine des agglutinines, et c'est encore elle qui est agglutinée.

Étant donnée l'identité de l'agglutination, quelle que soit l'origine des cellules qui la subissent, il est probable que la signification de la couche périphérique de la cellule, tant lors du phénomène même que lors de la production de l'agglutinine, est d'ordre général. Dans cette hypothèse, on conçoit l'importance de la constitution de cette enveloppe cellulaire.

Si cette enveloppe est constituée de substances susceptibles de provoquer une réaction organique, il y a avantage, au point de vue de l'abondance des produits de réaction, les agglutinines,

que cette enveloppe soit très développée comparativement au poids du microbe. Or les microbes ciliés, dont on connaît la facilité d'agglutination, sont précisément dans ce cas. Chez eux, les cils ne sont autre chose que des expansions de la couche corticale, dont la masse se trouve ainsi accrue par rapport au poids de la cellule.

Injectés à l'organisme, ils y introduisent une plus grande quantité de substance agglutinable, d'où une formation plus active de substance agglutinante. D'autre part, il y aura, lors de l'action de l'agglutinine sur le microbe, fixation plus abondante de celle-ci. Chaque microbe imprégné portera sur lui une masse plus considérable de matière agglutinée. Si donc l'agglomération est le résultat de forces attractives ayant leur siège dans cette matière agglutinée, on conçoit qu'elle se fera d'autant plus rapidement que la masse de matière agglutinée est plus importante vis-à-vis de la masse totale du microbe.

Il est évidemment difficile, en raison de mille facteurs pouvant agir en sens inverse, de comparer à cet égard les résultats fournis par des espèces microbiennes différentes. Cependant si ces espèces sont très rapprochées, comme c'est le cas du *bacillus typhosus* et du *bacterium coli*, il est intéressant de voir si la prévision se réalise. Or, M. Malvoz a bien voulu me communiquer le résultat d'observations qu'il avait eu l'occasion de faire au cours de la vaccination contre ces deux espèces microbiennes. Injectés à dose égale à des animaux de même espèce, ces deux microbes produisent tous les deux un sérum agglutinant. Mais c'est toujours le *bacillus typhosus*, le plus chevelu des deux, dont le sérum est le plus rapidement et le plus activement agglomérant.

Les faits connus jusqu'aujourd'hui tendent donc à faire admettre que le premier acte dans le phénomène de l'agglutination est l'altération colloïdale des couches protoplasmiques corticales, causée par leur imprégnation par l'agglutinine spécifique.

Après cette longue analyse des phénomènes d'agglutination, il est utile de récapituler les données principales de cette étude :

L'injection du sang défibriné de la poule au lapin produit chez ce dernier au moins 3 réactions, aboutissant à la formation

des substances précipitante, agglutinante et sensibilisante.

Ces trois réactions sont nettement distinctes l'une de l'autre, tant en ce qui concerne les propriétés de leur produit qu'au point de vue de son origine. L'action de ce produit est spécifique, c'est-à-dire qu'il porte exclusivement son action sur l'élément producteur.

Divisons le sang en sérum et globules: la substance précipitante, due à l'injection du sérum seul, agit sur le sérum, non sur les globules.

L'agglutinine spécifique et l'anticorps produits par la vaccination par les globules isolés, portent leur action sur ces derniers uniquement.

Dans le sérum, c'est la globuline seule qui entre en jeu lors de la formation de la substance précipitante, c'est uniquement elle qui est précipitée.

Dans les globules, la partie seule active dans la production de l'agglutinine, c'est la paroi globulaire; c'est encore elle qui est intéressée dans l'agglutination.

Au contraire, le contenu cellulaire produit l'anticorps, et c'est probablement dans l'action de cet anticorps sur le contenu cellulaire qu'il faut voir la cause de l'action sensibilisante de l'anticorps dans la globulolyse.

Si l'on examine toutes ces actions, précipitante, agglutinante, sensibilisante, on voit que, sous leur diversité d'aspect si grande, elles cachent toutes un fond commun. Toutes semblent provoquées par l'union d'un élément du sérum de l'animal vacciné avec le produit qui a servi dans la vaccination Quelle est la nature de cette union? Comme l'a montré l'analyse faite au sujet de l'agglutination, il serait difficile de trancher la question dès aujourd'hui; on peut affirmer, semble-t-il, qu'il ne s'agit pas de fermentation due à des enzymes. Mais décider s'il y a réellement combinaison chimique, ou simplement accollement moléculaire, absorption, et dans quels rapports moléculaires l'union se fait, voilà ce qui ne peut se faire sans dépasser les données de l'expérience.

Quant au produit de l'union, il se caractérisera par les propriétés de l'élément qui a produit la réaction organique. La globuline est une substance qui, dans le sérum, est à la limite de la solubilité, elle sera rendue insoluble. Le protoplasma cortical est

dans des conditions d'équilibre délicates avec le milieu ambiant, sa transformation rompra cet équilibre. De même, quand par suite de l'action des alexines sur les globules, le contenu de ces derniers est sur le point de s'épandre au dehors, l'action de l'anticorps sur ce contenu active la perte d'équilibre, d'où résulte la globulolyse.

Cette analogie pourra être poussée plus loin si, sortant des expériences citées dans ce travail, on tâche de se rendre compte de l'action des antitoxines sur les toxines, des antienzymes sur les enzymes. Ici encore, l'union se fait de telle sorte que la caractéristique de l'élément producteur des antitoxines et des antienzymes, la toxine ou l'enzyme, disparaît dans le produit de leur union. La neutralisation de la première se caractérise par la perte de la toxicité, celle de la seconde par la perte du pouvoir ferment. Et l'on sait que la production d'une antitoxine après vaccination par la toxine, ou celle d'une antienzyme après injection de l'enzyme, sont des phénomènes du même ordre que la formation de l'agglutinine ou de l'anticorps. Il apparaît de ce fait une grande unité parmi ces phénomènes, unité qui doit avoir sa raison d'être et dans l'unité de la réaction organique et dans l'unité du mode de neutralisation.

En ce qui concerne la première, il y a lieu de faire ressortir que toutes les substances dont l'injection a pu produire jusqu'aujourd'hui la formation d'antagonistes, sont des albuminoïdes [1].

On a pu soutenir que telle ou telle solution de toxine ou d'enzyme ne donnait plus la réaction du biuret. L'absence de cette réaction colorante, fût-elle même dûment constatée dans des solutions *concentrées*, ne suffirait pas à elle seule pour refuser à la substance le caractère de protéide. Nous possédons, comme l'a démontré Kossel, un meilleur moyen pour caractériser ces dernières, c'est l'action des sucs digestifs et spécialement de la trypsine. Ces enzymes semblent ne s'attaquer qu'aux substances basées sur un type chimique non encore déterminé, le type des albuminoïdes. Or, ne sait-on pas que toutes les toxines, les enzymes et les protéides en général sont détruits par les ferments protéolytiques?

1. Je ne puis en effet classer parmi les sérums antagonistes le sérum antiarsénieux de Besredka, qui ne protège que contre la dose simplement mortelle.

C'est justement en cela qu'il faut chercher la raison de l'impossibilité d'obtenir des sérums précipitants, agglutinants, dissolvants, antitoxiques, antienzymiques, quand on administre les substances actives par le tube digestif.

Pour ce qui est de l'analogie dans les phénomènes de neutralisation, il me suffira de dire que les conditions de cette neutralisation, mises en lumière par les travaux de Briot et Morgenroth pour les antienzymes, par ceux d'Ehrlich, de Knorr, de Madsen, de Kossel, de Camus et Gley, de Stephens et Myers pour les antitoxines, rappellent complètement celles qui ont été exposées précédemment au sujet des agglutinines. Et ici aussi, il semble qu'avant de s'engager trop avant dans les théories chimiques de neutralisation, il serait bon de voir si de simples actions d'agrégation moléculaire, de conditions de solubilité, de coagulation (au sens le plus large du mot) ne rendent pas aussi bien compte de la perte des propriétés actives. Ainsi se trouverait établie l'unité avec les phénomènes de précipitation, d'agglutination, de globulolyse qui semblent moins dépendre de combinaisons chimiques que des rapports de molécules entre elles et avec le liquide qui les entoure.

C'est, comme on le voit, en arriver à des idées soutenues depuis longtemps par Duclaux.

Pour conclure en quelques mots, il semble que l'on puisse dire dès aujourd'hui que l'organisme des oiseaux et des mammifères possède la propriété de réagir vis-à-vis de l'introduction des albuminoïdes (par une voie excluant l'action des sucs digestifs), en élaborant des albuminoïdes nouveaux doués, vis-à-vis de la substance injectée, d'une affinité bien marquée, dont la nature n'est pas encore déterminée.

On conçoit *a priori* qu'il sera souvent pratiquement difficile, sinon impossible, de mettre en évidence la nouvelle qualité du sérum. Quand, par suite de caractères spéciaux (toxicité, pouvoir fervent, solubilité), l'albuminoïde injecté se différencie facilement, il sera aisé de prouver l'existence de l'antagoniste par la disparition ou la transformation de ces qualités, après le mélange de l'albuminoïde avec le sérum. Mais il ne faut pas induire, de la non-existence d'un signe de neutralisation, au défaut de celle-ci. Le grand nombre de sérums actifs déjà connus plaide en faveur de la généralité, de la constance, de la

réaction. Et il est certain, dès à présent, que les travaux des bactériologistes ont amené la découverte d'une loi de physiologie générale, dont il reste à déterminer plus exactement les conditions et la portée.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bordet. — Les leucocytes et les propriétés actives du sérum. (*A. I. P.*, 1895.)
2. Bordet. — Sur l'agglutination et la dissolution des globules rouges. (*A. I. P.*, 1898.)
3. Ehrlich et Morgenroth. — Zur Theorie der Lysinwirkung, Ueber Hœmolysine. (*Berliner klinische Wochenschrift*, 1899.)
4. Von Dungern. — Globulicide Wirkungen des thierischen Organismus. (*Münchener medicinische Wochenschrift*, 1899.)
5. Landsteiner. — Zur Kenntniss der specifisch auf den Blutkörperchen wirkenden Sera. (*Centralblatt fur Bakteriologie*, 1899.)
6. Bordet. — Agglutination et dissolution des hématies. (*A. I. P.*, 1899.)
7. Tchistovitch. — Études sur l'immunisation par le sérum d'anguille. (*A. I. P.*, 1899.)
8. Delezenne. — Coagulation du sang d'oiseaux. (*Archives de médecine expérimentale*, 1899.)
9. Gengou. — Agglutinines et lysines. (*A. I. P.*, 1899.)
10. Duclaux. — Traité de Microbiologie, tome II.
11. Gruber. — Zur Theorie der Agglutination. (*Münchener medicinische Wochenschrift*, 1899.)
12. Nicolle. — Recherches sur la substance agglutinée. (*A. I. P.*, 1898.)
13. Malvoz. — Agglutination par des substances chimiques. (*A. I. P.*, 1897.)

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU GONOCOQUE
ET DE SA TOXINE

PAR LE Dr J. DE CHRISTMAS

DEUXIÈME MÉMOIRE

Dans un précédent mémoire [1], j'ai donné les résultats de quelques expériences sur le gonocoque et sa toxine, qui peuvent se résumer ainsi :

Le gonocoque élabore en milieu approprié des produits toxiques qui, injectés à des animaux de laboratoire, produisent des phénomènes d'intoxication locaux et généraux, en provoquant de la congestion et de la suppuration dans les tissus, ainsi que des phénomènes de fièvre et de cachexie, si on les injecte dans le système sanguin. La suppuration produite par la gonotoxine se manifeste particulièrement quand on l'injecte dans la chambre antérieure de l'œil, dans la plèvre et le péritoine, ainsi que dans l'urètre humain, où cette toxine produit un afflux leucocytaire, remarquable tant par son acuité que par l'abondance du pus, pouvant simuler une véritable blennorrhagie et guérissant spontanément en quelques jours.

La substance toxique se trouve en partie dans les corps mêmes des gonocoques, en partie dissoute dans le liquide de culture. Elle est de nature albuminoïde et se laisse précipiter des cultures par l'alcool fort. Elle est soluble dans la glycérine et se détruit par un chauffage prolongé.

Il est possible d'immuniser les animaux contre cette toxine en procédant par inoculations successives de doses croissantes. A l'appui de cette affirmation, j'avais publié les courbes de poids de lapins et de chèvres soumis à l'injection de fortes doses de toxine.

1. *Ces Annales*. Août 1897.

Depuis cette publication, la biologie du gonocoque a été l'objet de plusieurs travaux, dont la plupart sont en contradiction avec mes observations. C'est ainsi que M. Wassermann [1], dans un travail paru en même temps que le mien, constate les effets toxiques des cultures. Mais la toxine, selon lui, se trouve confinée dans les gonocoques seuls : ceux-ci n'élaborent aucun produit toxique, et si on trouve de faibles traces de toxine dans le liquide de culture, celle-ci ne provient que des corps de gonocoques morts, dont la toxine a diffusé dans le liquide. Les essais d'immunisation avec cette « toxine » n'ont pas réussi. M. Wassermann a indiqué un milieu albuminé : sérum de porc rendu très alcalin avec de la nutrose et par ce fait incoagulable à la chaleur, et dans lequel le gonocoque, selon lui, se développe très bien. Il est probable que ce milieu, qui ne m'a donné que de médiocres résultats quant au développement du microbe, ne permet pas un rendement appréciable en toxine.

Comme on le verra plus loin, le pouvoir toxigène du gonocoque dans les cultures est peu manifeste dans les milieux ordinaires, et il est soumis à des variations considérables, dont les raisons échappent facilement à l'observation.

M. Nicolaysen [2] constate également que les corps des gonocoques renferment une toxine qui tue la souris à faible dose, mais ses cultures filtrées se sont toujours montrées inertes.

M. T. Laitinen [3] ne trouve que peu de toxine dans les corps des gonocoques. La culture filtrée ne renferme probablement aucune substance toxique ; en tout cas celle-ci est si faible qu'elle ne se distingue pas dans ses effets de ceux de la substance albuminée, qui sert de milieu de culture.

M. Schaeffer [4], seul entre les auteurs nommés, semble avoir obtenu des cultures toxiques. Il constate que l'injection de cultures débarrassées des gonocoques, dans l'urètre humain,

1. Wassermann, Ueber Gonokokkenkultur und Gonokokkengift, *Berliner klin. Wochenschr.*, 1897, n° 32.

Wassermann, Weitere Mittheilungen, *Zeitschr. f. Hygiene und Infectionskr.*, Bd. *XXVII.*

2. Lyder Nicolaysen, Zur Pathogenität und Giftigkeit des Gonococcus, *Centralbl. für Bakt.*, 1897, Bd. XXII.

3. T. Laitinen, Beiträge zur Kenntniss der Biologie des Gonococcus, *Centralbl. für Bakt.*, 1898, Bd. XXIII.

4. J. Schaeffer, Beitrag zur Frage der Gonokokkentoxine. *Fortschritte d. Med.* 1897, n° 21.

produit une inflammation aiguë d'assez courte durée et accompagnée d'un écoulement purulent. Il ne semble pas avoir étudié l'effet de cette toxine sur les animaux.

La réaction inflammatoire de l'urètre, à la suite d'injection de gonocoques morts, a également été étudiée par Panichi [1] et par Scholtz [2]. Ce dernier n'a pu trouver de toxine dans ses cultures en dehors des corps des gonocoques.

Moltschanoff [3] a observé des phénomènes de neurite et de dégénération des cellules nerveuses de la moelle, principalement des cornes antérieures, à la suite d'une intoxication chronique produite par l'injection de gonocoques dans le péritoine. Il n'a pas constaté la présence de toxine dans les cultures en dehors des gonocoques.

On voit, par ce court résumé des travaux parus jusqu'ici sur les effets toxiques du gonocoque, que la plupart des auteurs n'ont obtenu que des cultures sans toxine. Ceci tient sans doute à l'emploi d'un mauvais milieu de culture, et nous verrons tout à l'heure qu'il suffit de faibles différences dans la composition du milieu et de petits écarts de température pour rendre les cultures atoxiques. Mais en outre la gonotoxine, au contraire des poisons microbiens violents déjà si bien étudiés, ne manifeste pas sa présence par des phénomènes brusques d'intoxication. La cachexie consécutive aux injections sous-cutanées ou intraveineuses demande une observation soutenue pour être décelée, et les doses mortelles sont considérables, car si on peut tuer les jeunes cobayes en leur injectant 1 ou 2 c. c. de toxine dans le péritoine, les animaux plus âgés demandent des doses bien plus fortes, de 5 à 10 c. c., et l'injection de telles quantités d'un liquide, qui par lui-même et sans la toxine qu'il renferme est déjà capable de provoquer des phénomènes morbides en contact avec une séreuse aussi sensible que celle du péritoine, ne laisse pas de compliquer sérieusement les résultats et de rendre douteux tout essai d'évaluation de la toxine. L'injection sous-cutanée

1. Panichi, Contribution expérimentale à l'étude des toxines gonococciques. *Giorn. ital. delle mal. ven.*, 1899, fasc. 3, ref. in. *Revue générale de pathologie int*, vol. II., n° 19.

2. Scholtz, Biologie des gonococcus., *Archiv. für Dermatol. und Syphilis*, 1899, vol. 49.

3. Moltschanoff, Ueber das Gonococcentoxin und seine Wirkung auf das Nervensystem, *Münchener med. Wochenschr.*, 1899, n° 31.

présente les mêmes inconvénients. Les doses mortelles sont ici plus considérables que par la voie intrapéritonéale, et la production de vastes abcès qui à l'origine sont aseptiques, mais qui ne tardent pas à s'infecter, la cachexie consécutive, d'intensité variable, rendent illusoire toute évaluation tant soit peu exacte de la teneur en toxine des cultures.

L'injection de la toxine dans le système veineux du lapin ou du cobaye donne des résultats plus nets, en produisant des phénomènes morbides se manifestant par une perte de poids brusque et considérable, de la fièvre, et un état de cachexie suivi de la mort de l'animal, si la dose a été suffisante; mais les doses mortelles, quoique bien plus petites, sont pourtant encore trop élevées pour qu'on puisse séparer nettement l'effet de la toxine de celui du liquide injecté.

En cherchant s'il ne serait pas possible de rendre manifeste cette toxine en l'appliquant à d'autres organes, j'ai essayé si l'injection intracérébrale ne nous fournirait pas ce moyen, et j'ai de suite acquis la certitude que l'*injection de la gonotoxine dans le cerveau est un moyen sûr et facile pour son étude.* La méthode des injections intra cérébrales, d'abord préconisée par MM. *Roux* et *Borrel* pour la toxine tétanique [1], s'applique admirablement au dosage de notre toxine, qui s'est montrée un poison violent pour le système nerveux central, et dont il suffit d'injecter des doses très faibles pour amener à bref délai la mort de l'animal.

Voici ce qu'on observe en injectant dans le cerveau d'un cobaye adulte une dose mortelle d'une culture débarrassée des gonocoques. Pendant les trois ou quatre heures qui suivent l'injection, l'animal ne semble pas souffrant. Il court dans sa cage et mange comme à l'ordinaire. Mais, ce délai passé, il manifeste des signes non douteux de malaise. Il se met en boule dans un coin, ne mange plus, et ne change pas de place, quand on l'inquiète. Bientôt le corps est agité par de légères secousses, qui peu à peu augmentent d'intensité, les mouvements des membres deviennent incoordonnés, il tombe sur le flanc et n'arrive plus, malgré tous ses efforts, à se relever. Quelquefois on observe des crampes généralisées et intermittentes, mais ces crampes ne

1. E. ROUX ET BORREL, Tétanos cérébral et immunité contre le tétanos. *Ces Annales*, vol. XII, n° 4.

ressemblent nullement à celles qui suivent l'injection du poison tétanique, il n'y a pas de raidissement des membres ni opisthotonus. L'animal semble plutôt grelotter. La dyspnée à ce moment est violente, et la mort arrive bientôt, ordinairement vers la sixième heure après l'injection.

Il va sans dire que ces injections dans la masse cérébrale doivent être faites avec les précautions nécessaires pour éviter toute lésion étendue du cerveau. On les pratique dans l'un des hémisphères à l'aide d'une seringue, dont l'aiguille épointée et arrondie est munie d'un arrêt qui l'empêche de s'enfoncer de plus de deux ou trois millimètres dans la masse cérébrale. L'ouverture du crâne se fait, après incision de la peau, avec un trépan très fin ou un foret faisant une ouverture juste suffisante pour l'introduction de l'aiguille. Faite dans ces conditions, l'opération est absolument inoffensive et n'influence nullement la santé des animaux. L'introduction d'une certaine quantité de liquide dans le cerveau est également supportée sans phénomènes morbides, et les expériences de contrôle dans ce sens m'ont démontré qu'on peut introduire jusqu'à 0,25 c. c. du liquide de culture stérile, sans autre danger pour l'animal que des phénomènes de compression légers et passagers. Tout autre est le résultat quand le liquide renferme de la toxine. Il suffit alors de 1,500^e de c. c. ou moins, pour provoquer les phénomènes mortels décrits plus haut[1].

La vitesse avec laquelle agit la toxine gonococcique sur le cerveau est remarquable, et semble distinguer nettement cette toxine des toxines connues jusqu'ici, et qui demandent au moins 24 heures pour arriver au maximum de leurs manifestations. Cette vitesse d'action dans le cerveau est analogue à la vitesse des phénomènes inflammatoires de la gonotoxine injectée dans l'urètre humain, où les premières manifestations de la diapédèse s'observent moins d'une heure après l'injection.

A l'autopsie on ne trouve aucune altération appréciable de la masse cérébrale. L'endroit où l'aiguille a été introduite est à peine visible, il ne présente aucun signe d'inflammation ou

1. Ce travail était à l'impression quand a paru la communication de M. Borrel à la Société de Biologie (avril 1900) sur la toxicité de la tuberculose et de la malléine en injections intracérébrales, comparée à leur peu de toxicité en injections sous-cutanées. Il est probable que beaucoup d'autres toxines se comportent d'une manière analogue.

d'irritation, et l'examen microscopique ne montre aucune formation de pus. A peine si l'on trouve quelques rares leucocytes dans la plaie.

Cet empoisonnement aigu des animaux, par la toxine qui nous intéresse, se produit avec une précision et une régularité parfaites, et il nous permettra de résoudre différentes questions concernant les propriétés de cette toxine, jusqu'ici restées si obscures, faute d'un réactif convenable. Entre ces problèmes, ceux qui concernent la production de la toxine dans les cultures, le milieu pour son obtention, les conditions de température ainsi que la marche dans la production sont ceux qui se présentent les premiers à l'esprit. Les recherches de cette nature sont longues et difficiles, surtout quand il s'agit d'un microbe d'une culture délicate et capricieuse comme le gonocoque : aussi les résultats auxquels je suis arrivé ne peuvent-ils être considérés comme définitifs il est probable ; que l'avenir y apportera de nombreuses modifications.

La production de toxine dans le milieu de culture ordinairement employé pour le gonocoque, c'est-à-dire 1/3 de liquide d'ascite pour 2/3 de bouillon renfermant 1 0/0 de peptone, n'est pas considérable.

Après 8 jours de séjour à l'étuve, les germes sont ordinairement morts, et le liquide filtré, injecté dans le cerveau du cobaye, ne le tue qu'à la dose de 0,1 à 0,15 c. c. Les cultures actuelles, qui restent vivantes de 5 à 6 semaines ou plus, renferment après 25 jours de culture une toxine qui tue à la dose de 0,002 c. c. et moins.

Cette toxine est-elle le résultat d'un processus vital du gonocoque ou serait-elle seulement due à la diffusion de produits toxiques renfermés dans le corps du microbe et rendus libres par sa mort, comme l'a supposé M. Wassermann ? Une expérience bien simple nous renseignera. Prenons une culture de gonocoques en pleine évolution, âgée de trois ou quatre jours. A ce moment, si le liquide est d'une composition convenable, le fond du vase est déjà couvert d'une couche assez épaisse de gonocoques, dont la plupart ont gardé leur forme et se colorent très bien. Ils sont donc encore parfaitement vivants, et n'ont

pas encore subi la dégénération nécessaire pour que leur toxine soit transfusée dans le milieu de culture. Du reste, le liquide filtré est, à cette période de la culture, très peu toxique, et il en faut une assez forte dose pour tuer un cobaye par intoxication cérébrale.

Enlevons avec une pipette stérile le liquide qui couvre cette couche de gonocoques, et remplaçons-le par une petite quantité de liquide frais de même composition, mais dans lequel aucun développement n'a eu lieu. La culture ainsi préparée est placée à une température de 20°, à laquelle les gonocoques ne peuvent plus se développer, et qui les tue en quelques heures. Si après 8 ou 10 jours nous examinons la culture au microscope, nous trouvons en effet que les gonocoques ne se colorent plus que faiblement. Ils sont dégénérés et ont absolument le même aspect qu'une culture morte de vieillesse après quelques semaines. La culture ainsi préparée et débarrassée des gonocoques devrait nous donner, si l'explication était vraie, un liquide toxique à la suite de la transfusion de la toxine. Il n'en est rien, et nous trouvons au contraire un liquide entièrement dépourvu de toxicité. L'injection dans le cerveau du cobaye ne produit aucun phénomène d'intoxication, et l'introduction de ce liquide dans l'urètre humain n'occasionne aucune suppuration, comme on en voit toujours en employant un liquide toxique.

Cette expérience prouve donc nettement que la toxine renfermée dans le corps des gonocoques ne transfuse pas dans le milieu de culture, et que si les auteurs n'ont pas trouvé celui-ci d'une toxicité appréciable, ceci tient à la composition de leur milieu, peu approprié à l'obtention d'une bonne toxine. Du reste, le fait même de la production de la toxine dans un milieu de culture de composition différente de celle ordinairement employée prouve bien qu'il s'agit ici d'autres choses que d'une simple diffusion de produits toxiques.

* *

Les variations dans le milieu de culture ont porté sur les trois composants du liquide : le bouillon, la peptone et l'albumine.

Il est possible de faire vivre le gonocoque dans un milieu

albuminé qui ne renferme pas de bouillon, et le développement peut s'y faire assez abondamment. Mais la production de toxine en souffre au point de devenir presque nulle.

Il est donc évident que les substances extractives de la viande jouent un rôle important. Mais tous les bouillons ne conviennent pas à ces cultures, et le choix de la viande est loin d'être indifférent. Le bouillon de cheval, de bœuf, la décoction de différents organes comme le foie de veau ou de cheval, le poumon, le bouillon de poisson, la décoction de levure ne donnent que des cultures médiocres. Le bouillon de lapin, de veau, de poulet donne au contraire un excellent développement. Il est bon d'ajouter de la gélatine à la décoction sous forme de feuilles de gélatine surfine à la dose de 2 à 3 grammes par litre. Le bouillon dont j'obtiens les meilleurs résultats se compose de 500 grammes de viande de veau fraîche et hachée pour 1 litre d'eau, le tout chauffé une demi-heure à 105° après quelques heures de macération dans l'eau tiède. Ce bouillon est facile à obtenir clair après une ou deux filtrations. Il est nuisible d'y ajouter du chlorure de sodium.

Cet extrait est de trop faible concentration pour le milieu de culture qui donne le meilleur rendement en toxine, et qui ne renferme (en volume) que 25 0/0 de bouillon. Il faut donc le concentrer en l'évaporant jusqu'à un quart de son volume. L'extrait de 500 grammes de viande se trouve par ce fait dissous dans 250 grammes d'eau. Il y a avantage à procéder de cette manière au lieu de préparer de suite un bouillon très concentré, qui est difficile à filtrer.

Le second élément du milieu, la peptone, a jusqu'ici paru indispensable pour l'obtention d'une culture de gonocoque. Il est en effet certain que la culture en milieu peptonisé évolue abondamment, et que le gonocoque qui n'a pas été entraîné à vivre dans un milieu sans peptone s'y développe au commencement assez mal. Il s'y habitue pourtant bien après quelques passages, et ceci est important, car *la production de toxine est moins bonne en milieu peptonisé*. En outre, la peptone a une influence indéniable sur la vitalité du gonocoque, qui reste vivant beaucoup plus longtemps dans le milieu non peptonisé. Cette constatation s'est montrée exacte pour toutes les peptones essayées, autant pour celles du commerce que pour la peptone

préparée au laboratoire selon le procédé de M. Martin. La survie du gonocoque dans les milieux peptonisés est de 8 à 10 jours, tandis qu'il reste vivant de 40 à 50 jours dans les cultures non peptonisées. Le manque de toxicité des cultures peptonisées ne trouve pourtant pas son explication dans cette courte survie, car la production de toxine est déjà sensible dans les cultures non peptonisées après 4 à 5 jours.

J'ai donc supprimé la peptone de mes cultures.

L'albumine, sans laquelle aucun développement de gonocoque ne semble possible, doit être choisie avec un soin tout particulier. Le sérum sanguin des animaux d'abattoir ne convient pas à ces cultures. Quelques-uns, comme les sérums de bœuf et de porc, permettent des cultures peu fournies, peu toxiques et de vie très courte ; d'autres, comme le sérum de cheval, s'opposent à tout développement. Le gonocoque est, sous ce rapport, d'une sensibilité extrême. Le meilleur développement s'obtient dans le sérum de lapin et dans le liquide d'ascite. Ce dernier, d'abord indiqué par M. Marmorek pour la culture du streptocoque, est facile à obtenir en grande quantité. Il est d'une conservation parfaite après une stérilisation fractionnée, et il me sert à l'exclusion de tout autre, comme je l'ai déjà indiqué dans un précédent mémoire. Mais au lieu d'employer un milieu de culture composé de 2/3 de bouillon pour 1/3 de liquide d'ascite, j'emploie actuellement des solutions d'albumine beaucoup plus concentrées, renfermant 75 0/0 de liquide d'ascite pour 25 0/0 de bouillon. Il est difficile d'obtenir l'accoutumance du gonocoque à ces solutions concentrées, et ce n'est qu'à la suite de nombreuses cultures successives qu'on obtient un développement abondant. Au fur et à mesure de l'accoutumance, le gonocoque devient plus résistant, et la fonction toxigène augmente dans des proportions considérables.

Le gonocoque, dans ce milieu albuminé, a un peu changé d'aspect. Il est devenu plus petit que dans les cultures ordinaires, il garde mieux sa forme en grain de café, et les formes boursouflées, si fréquentes avant, ne se rencontrent plus. La dégénérescence se produit moins vite, et même, dans les cultures âgées de 2 mois, on trouve beaucoup d'individus ayant gardé leur forme, se colorant vite et avec intensité.

1. L. Martin, Production de la toxine diphtérique. *Ces Annales*, 1898, n° 1.

Le degré d'alcalinité du liquide d'ascite a aussi son importance et, comme il varie, on doit le déterminer dans chaque cas. Pour neutraliser les liquides trop alcalins, je me suis servi de l'acide lactique de préférence aux acides minéraux, qui semblent entraver le développement.

Malgré toutes ces précautions, la culture du gonocoque reste toujours chose assez délicate. Après une longue série de bonnes cultures, on observe quelquefois un ralentissement dans le développement, dont les causes souvent échappent. La production de toxine peut également varier dans des proportions considérables. Il est possible que des variations dans la composition du sérum d'ascite en soient la cause, mais nous sommes jusqu'ici réduits à des suppositions.

Quand le développement est normal, la poussée est caractéristique, et on peut, d'après la marche de la culture, juger de la quantité de toxine qu'elle renfermera. Le développement est d'abord très rapide et abondant, à condition d'ensemencer avec une culture sur sérum de lapin, jeune de deux ou trois jours. Douze heures après l'ensemencement, le liquide est déjà finement troublé dans toute son étendue. La poussée des premiers jours se fait de préférence vers la surface, qui se couvre d'un léger voile crémeux. Peu à peu le liquide s'éclaircit, et le développement continue alors plus lentement au fond du ballon, où il se forme une couche uniforme, grisâtre, épaisse et visqueuse, qui adhère assez fortement au verre et qui envoie des prolongements légers, flottant dans le liquide. Si le développement se fait en grumeaux au fond du vase, ou s'il reste confiné à la surface, la culture ne produira que peu ou pas de toxine. La forte poussée se ralentit après quatre ou cinq jours, mais les gonocoques continuent à se multiplier au fond, en formant de grandes colonies adhérentes, tandis que le liquide s'éclaircit entièrement. Ce mode de développement est aisé à suivre sur les préparations colorées à la thionine. On constate même, après quatre semaines ou plus de culture, qu'à la périphérie de ces colonies, dont presque tous les individus sont morts et par conséquent peu colorés, il existe encore des germes qui se colorent fortement et qui gardent leur forme primitive. Tant qu'on trouve ces formes dans la culture, celle-ci est encore vivante et donnera de nom-

breuses colonies sur le sérum de lapin. Cette poussée lente et presque cachée de gonocoques survivants après la forte poussée du début ne manque pas d'analogie avec la manière dont l'urétrite aiguë chez l'homme se change en inflammation chronique, dont l'évolution excessivement lente est très probablement due à la pullulation ralentie, mais persistante, des germes dans le tissu glandulaire profond de la muqueuse urétrale.

La meilleure température, autant pour la production de la toxine que pour le développement de la culture, se trouve entre 36° et 37°. Le développement est encore bon à 38°, mais la production de toxine diminue et la survie est beaucoup moins longue.

*
* *

La production de toxine dans les cultures suit une marche très régulière, comme cela ressort du tableau ci-après, qui indique la toxicité des cultures à différentes époques de la poussée.

Avant l'injection, le liquide de culture était débarrassé des gonocoques par filtration sur talc. Par ce procédé, qui consiste à filtrer sur une légère couche de talc adhérant au papier à filtrer ordinaire, on obtient une séparation parfaite du liquide et des gonocoques, qui restent sur le papier grâce à leur viscosité. La filtration sur porcelaine ne donne pas un bon résultat, elle est longue et la bougie retient une forte proportion de la toxine. Le filtre en terre d'infusoires laisse passer le poison en totalité.

Les cobayes employés dans cette expérience pesaient de 250 à 300 grammes. L'injection était faite autant que possible au même endroit du cerveau, et la quantité de liquide injectée était toujours de 0,05 c. c. La dilution de la toxine a été faite avec une solution physiologique de chlorure de sodium stérilisée. Les chiffres indiquent la quantité réelle du liquide de culture injecté.

	CULTURE AGÉE DE						
	24 heures.	2 jours.	4 jours.	8 jours.	20 jours.	30 jours.	40 jours.
0,05 cc.	0	—	+				
0,025		0	+				
0,01 cc.			—	+			
0,005				+			
0,0025				—	+	+	+
0,001					—	+	—
0,0005					—	—	—
0,00025					0	0	0

0 indique que l'animal n'a pas souffert de l'injection.
— indique symptômes manifestes d'intoxication sans mort.
+ indique mort de l'animal 5 à 10 heures après l'injection.

Ce tableau permet de constater que la production de toxine, faible après 24 heures de développement, s'accroît rapidement pour atteindre le maximum vers le vingtième jour, où elle tue à la dose de 1/500e ou quelquefois 1/1000e de centimètre cube. Cette force toxique reste stationnaire les jours suivants, et ne semble pas diminuer tant que la culture reste en vie. Dans les cultures mortes conservées à la température ambiante, même à l'abri de la lumière, la toxicité diminue assez vite. Déjà après quelques semaines, elle a diminué de moitié ou plus. Le mélange de toluol à la toxine la détruit vite.

La toxine gonococcique se laisse précipiter en totalité de la culture par l'alcool fort, ou mieux par le sulfate d'ammoniaque en solution sursaturée, selon le procédé connu. Elle peut se redissoudre dans l'eau. Mais à la suite de ces manipulations, le poison subit sans doute quelque modification dans sa constitution chimique, car, inoculé dans le cerveau, son action s'est ralentie, et la même toxine, qui avant tuait en 5 à 10 heures, ne tue plus qu'au bout de 12 à 20 heures. Il ne s'agit pas ici d'un simple affaiblissement, car la dose mortelle reste la même.

Le degré de chaleur auquel la toxine gonococcique est détruite a été déterminé en chauffant la culture filtrée enfermée en tube clos au bain-marie. Dans une première série

d'essais, les tubes étaient plongés 15 minutes dans l'eau tenue à la température voulue, et immédiatement après inoculée dans le cerveau de cobayes à la dose de 0,05 c. c. sans dilution préalable.

Le résultat de ces expériences a été le suivant :

Toxine chauffée à	60°	} mort en 5 heures et demi.
—	65°	}
— —	70°	mort en 8 heures.
— —	75°	l'animal est très malade, mais revient à la santé.
—	80°	l'animal n'a montré aucun symptôme d'intoxication.

Cette toxine supporte donc un chauffage d'un quart d'heure à 65° sans altération. De 65° à 75°, elle s'altère ; elle est détruite de 75° à 80°.

Dans une autre série d'essais, j'ai constaté que la toxine supporte un chauffage de 90 minutes à 60° sans altération, car les animaux succombent dans les délais normaux ; mais si on la chauffe à 70° pendant une demi-heure, elle s'altère manifestement, ne provoquant que des phénomènes passagers d'intoxication.

Une petite quantité de glycérine ajoutée à la toxine la protège contre l'effet du chauffage, et la toxine glycérinée supporte sans altération sensible un chauffage à 80° pendant un quart d'heure.

La toxine gonococcique n'est pas dialysable à travers une membrane de parchemin, car une solution de toxine, qui tuait à la dose de 0,002 c. c., n'avait rien perdu de sa toxicité après 72 heures de séjour dans le dialyseur. Mais on observe ce phénomène intéressant que la toxine subit une modification analogue à celle qu'on constate en la précipitant du liquide de culture au moyen d'une solution de sulfate d'ammoniaque : c'est-à-dire que, tout en restant toxique à la même dose, les phénomènes d'intoxication changent. L'animal inoculé ne meurt plus en 5 à 10 heures comme avec la toxine normale, mais la mort arrive plus lentement, dans un délai qui peut varier de 20 jusqu'à 60 heures. Pendant tout ce temps, l'animal intoxiqué reste comme accroupi, couché sur le flanc, incapable de se lever ou de prendre de la nourriture, ne faisant que quelques faibles mouvements avec les membres. Il est rare que la survie dépasse de 20 heures l'inoculation, mais j'ai vu quelquefois l'empoison-

nement traîner jusqu'à 60 heures après. Ce ralentissement ne s'explique que par quelque modification dans la constitution chimique de la toxine à la suite de la dialyse, mais il ne constitue pas un affaiblissement réel de la toxicité, puisque la dose minima mortelle reste la même qu'avant.

On peut produire avec la toxine intacte une intoxication *non mortelle* en inoculant dans la masse cérébrale une dose de toxine suffisamment faible. Il est assez difficile de trouver juste la quantité qui ne tue pas, tout en étant assez forte pour produire des phénomènes d'intoxication. Quand on y arrive, on observe à la suite de l'inoculation les phénomènes ordinaires de l'intoxication. L'animal reste blotti dans un coin de la cage, incapable de bouger. Il ne peut se tenir debout, le corps est secoué par des contractions généralisées, et il tombe sur le flanc en faisant de vains efforts pour se relever. Le cobaye se remet lentement de cette intoxication et semble revenir quelques jours après à l'état normal.

L'animal qui a passé par une telle intoxication chronique est *fortement immunisé* contre une nouvelle injection cérébrale, et il supporte sans malaise une dose considérable de toxine. Il n'est pas nécessaire, dans ce cas, que l'injection soit faite dans le même hémisphère, le cerveau entier est rendu réfractaire par le fait de la première injection. Voici à ce sujet une observation typique d'immunisation cérébrale.

Six cobayes du poids de 300 grammes environ reçoivent 0,002 c. c. de toxine, qui tuait les animaux de contrôle à la dose de 0,004 c. c. Les animaux sont manifestement malades, mais se remettent dans les 24 heures suivantes. Huit jours après, on leur injecte dans l'autre hémisphère une toxine de la même force que la précédente à la dose de 0,02 c. c.

A la suite de cette injection, 2 animaux sont morts en présentant les phénomènes usuels de l'intoxication gonococcique. Les 4 autres se remettent après avoir été gravement malades. Ceux-ci sont derechef fortement immunisés, car ils supportent 8 jours plus tard l'injection d'une dose de 0,1 c. c. d'une toxine qui tuait à la dose de 0,001 c. c., par conséquent une dose 100 fois mortelle. Ces animaux immunisés résistaient également à l'injection d'une émulsion de corps

morts de gonocoques, dont la toxicité pour le cerveau est considérable.

L'immunisation contre l'intoxication cérébrale peut également être obtenue par l'injection *sous-cutanée* de fortes doses de toxine. Mais cette immunisation s'obtient bien plus lentement que par l'application directe de la toxine sur le cerveau. Les injections doivent être faites pendant un temps assez long et à des doses considérables, comme cela ressort de l'expérience suivante, qui résume de nombreux essais.

Un lot de 10 cobayes reçoit dans le tissu sous-cutané des doses croissantes de toxine, en augmentant graduellement de 5 c. c. à 100 c. c. dans l'espace d'un mois. Un cobaye reçoit au bout de 15 jours une dose de toxine qui tue le cobaye de contrôle en 5 heures. Il meurt 6 heures après l'injection. Même résultat pour un animal inoculé après 3 semaines d'immunisation.

Après un mois, 1 animal, sur 2 inoculés, résiste. Il était gravement malade et se remettait lentement de l'intoxication.

Après 6 semaines, les animaux avaient reçu une dose totale de toxine de 160 c. c. A ce moment, 2 nouveaux inoculés résistaient encore à l'intoxication. Après 2 mois, les 4 animaux restant ont reçu la dose totale de 300 c. c. Les phénomènes d'intoxication se sont maintenant fortement atténués. La santé des animaux est à peine influencée par une dose de toxine, qui tuait infailliblement les animaux de contrôle dans l'espace de 5 à 6 heures.

On voit donc qu'il est parfaitement possible d'immuniser les animaux de laboratoire contre la gonotoxine. J'en avais déjà donné la preuve dans un premier mémoire, mais la réalité de cette immunisation ayant été niée, il m'a semblé nécessaire d'en faire de nouveau la démonstration par la méthode d'inoculation cérébrale, qui donne des résultats d'une si grande précision.

Il était intéressant de fixer le degré de dilution de la toxine pouvant encore manifester sa présence dans l'urètre humain en produisant une légère urétrite, comme cela a été décrit précédemment. Il est évident qu'on ne peut fixer cette dose avec la même exactitude que pour les injections cérébrales, faute de sujets d'expérience, et parce qu'il arrive un moment où la diapédèse leucocytaire devient si minime qu'elle est difficile à

constater. Tout ce qu'on peut indiquer à ce sujet, c'est qu'on observe encore une suppuration urétrale manifeste avec sécrétion muco-purulente et sensation de brûlure, en employant une dilution de toxine au 1/10e et en injectant 2 c. c. de cette dilution dans la partie antérieure de l'urètre, où on doit la laisser en contact avec la muqueuse pendant 2 ou 3 minutes.

L'injection sous-cutanée de la toxine gonococcique a pour résultat la production d'une antitoxine dans l'organisme animal. Les expériences détaillées concernant la formation de cette antitoxine feront l'objet d'un travail ultérieur. Aujourd'hui, je me contenterai de donner sommairement les preuves de son existence dans le sang de chèvres ayant reçu de fortes doses de toxine dans le tissu sous-cutané, preuves dont la démonstration devient maintenant très aisée, grâce aux injections cérébrales, qui nous permettront également d'évaluer la force antitoxique du sérum avec une exactitude très suffisante.

Les très nombreux essais dans cette voie se résument ainsi.

Il est possible de neutraliser les effets de la toxine en la mélangeant, avant l'injection, avec une certaine quantité d'antitoxine. Le mélange doit avoir lieu quelques heures avant l'injection, car la « neutralisation » de la toxine ne se fait pas immédiatement après le mélange, comme cela a lieu pour la plupart des autres toxines, et notamment le poison diphtérique ; mais elle demande un certain temps pour s'effectuer — de 3 à 4 heures environ à la température de 15° [1]. Sans cette précaution on n'obtient pas le plein effet antitoxique. Il va sans dire que les expériences de contrôle ont prouvé que les mélanges de sang normal avec la toxine sont impuissants à produire un effet antitoxique quelconque.

L'injection cérébrale d'un mélange de sérum ou de toxine, dans lequel la neutralisation est complète, ne produit aucun phénomène d'intoxication. L'animal remis de l'anesthésie ne présentera aucun symptôme morbide. Si la neutralisation n'est pas parfaite, on observera des phénomènes d'intoxication plus

1. L'antitoxine tétanique semble se comporter d'une manière analogue. Voy. Th. Madsen : *Om Tetanolysinet.Oversigt over det Kgl. danske Vidensk. Selskabs. Forhandlinger*, 1899, nº 5.

ou moins violents, desquels l'animal peut se rétablir, mais qui peuvent aussi entraîner la mort dans un délai plus ou moins long, selon la quantité de toxine libre. La valeur antitoxique du sérum a été constamment en augmentation.

Elle était, au mois de décembre dernier, telle que 0,5 c. c. de sérum antitoxique neutralisait 10 c. c. de toxine renfermant 5.000 doses mortelles. Quelques mois avant (mai 1899), sa valeur était beaucoup moindre, car il avait fallu 1 c. c. de sérum pour neutraliser 10 c. c. de toxine, dont la toxicité était assez faible (0,004 c. c.). Il est probable que, grâce aux améliorations dans la préparation de la toxine et à l'emploi d'autres animaux que la chèvre, on obtiendra des résultats de beaucoup supérieurs.

L'effet neutralisant du sérum antitoxique ne se manifeste pas seulement *in vitro*, mais il a aussi une action très nette quand on l'injecte dans la masse cérébrale avant ou simultanément avec la toxine.

Voici à ce sujet une série d'essais où l'antitoxine et la toxine étaient injectées chacun dans un hémisphère.

La dose de toxine était de 0,004 c. c., le double de la dose mortelle chaque fois vérifiée sur un animal de contrôle. La dose de sérum était de 0,05 c. c.

Numéros.			
1	Injection de sérum	2 heures après la toxine	mort en 5 heures.
2	—	1 — après la toxine	mort en 5 heures.
3	—	30 minutes après la toxine	mort en 6 heures.
4	—	Simultanément avec la toxine.	Reste vivant après avoir été gravement malade.
5	—	24 heures *avant* la toxine.	L'animal est gravement malade et meurt 20 heures après avec un retard de 15 heures sur le contrôle.
6	—	48 — — —	Il ne semble pas souffrir de l'injection. Il court et mange comme à l'ordinaire.
7	—	72 — — —	Il donne des signes manifestes d'intoxication, mais se remet assez vite.
8	—	96 — — —	Mort 7 heures après l'injection de toxine.
9	—	120 — — —	Mort dans l'espace de 5 heures.

Il semble donc que l'immunité cérébrale obtenue avec ce sérum est assez fugace, et qu'elle ne dure guère au delà de trois jours.

Le sérum semble incapable d'arrêter une intoxication commencée. Ce résultat était à prévoir, vu la vitesse avec laquelle cette intoxication évolue habituellement.

Il est possible de prévenir l'intoxication cérébrale en injectant l'antitoxine dans le système veineux. L'effet est des plus nets, mais il faut que l'injection préventive soit faite quelque temps avant la toxine et la dose de sérum doit être relativement considérable (0,5 à 1 c. c.) :

Nos	Dose de toxine *	Dose de sérum	Temps passé entre les deux injections.	
1	0cc,01	0cc,5	simultanément	Mort en 5 heures.
2	0,01	0,75	—	Mort en 5 heures.
3	0,01	1	—	Mort en 5 heures.
4	0,01	0,5	20 heures	Mort en 10 heures.
5	0,01	1	20 —	Reste vivant après avoir été gravement malade.
6	0,01	0,5	48 —	Vivant, non malade.
7	0,01	1,	48 —	Vivant.
8	0,01	1,5	48 —	Vivant.

* La toxine était mortelle à la dose de 0cc,002.

Le sérum ne produit donc une immunité solide qu'à la condition d'être injecté 48 heures avant la toxine.

Pour que le sérum se montre efficace contre l'intoxication cérébrale en l'injectant par la voie péritonéale ou dans le tissu sous-cutané, il faut des doses considérables, et l'injection doit être faite 48 heures au moins avant la toxine. Dans ces conditions et en employant une dose de 3 à 5 c. c. de sérum, l'animal résiste et ne présente que des phénomènes atténués d'intoxication, même avec des doses de toxine plusieurs fois mortelles. Avec des doses inférieures de sérum, on observe quelquefois de la survie après des phénomènes d'intoxication violente, mais le plus souvent les animaux meurent à peu près en même temps que le contrôle.

*
* *

Les expériences qui précèdent peuvent se résumer dans les conclusions suivantes :

Le gonocoque élabore en milieu approprié des substances toxiques qui, à faible dose et appliquées dans la masse cérébrale, amènent la mort des animaux en produisant des phénomènes d'intoxication caractéristiques à évolution rapide.

La toxine se trouve en dissolution dans le milieu de culture.

Elle ne résulte pas d'une diffusion de toxine des corps morts des gonocoques, mais il s'agit d'un produit biologique, ne se formant que dans certaines conditions déterminées de culture.

La gonotoxine n'est pas dialysable.

Elle résiste à un chauffage de 60° pendant une heure au moins. Chauffée à 75° pendant 15 minutes, elle commence à s'altérer.

Elle se laisse précipiter de la culture par une solution saturée de sulfate d'ammoniaque.

L'injection de cette toxine dans le tissu sous-cutané des animaux de laboratoire produit la formation d'une substance antitoxique dans le sang.

Cette antitoxine neutralise *in vitro* la toxine gonococcique injectée dans la masse cérébrale quelque temps avant la toxine, elle arrête les phénomènes d'intoxication.

L'injection de l'antitoxine dans le système sanguin arrête également les effets de la gonotoxine dans le cerveau.

RECHERCHES SUR LE ROLE
DE L'OXYGÈNE DANS LA GERMINATION

Par M. P. MAZÉ

Préparateur à l'Institut Pasteur.

I

Les graines placées sur un substratum imbibé d'eau, exposées à l'air à une température convenable, entrent généralement en germination au bout d'un jour ou deux.

Si on prend la précaution de les recouvrir d'une couche d'eau de quelques millimètres d'épaisseur, elles ne germent pas. L'embryon se gonfle: la radicule peut quelquefois s'allonger de quelques millimètres; mais l'évolution s'arrète à ces premiers symptômes.

Ce fait s'explique très facilement, si l'on pense que les graines placées sous l'eau laissent diffuser des substances alimentaires qui favorisent le développement rapide des microorganismes; parmi ceux-ci, les espèces aérobies s'emparent de tout l'oxygène dissous, de sorte que le milieu ne réunit plus les conditions nécessaires à la germination des graines. On peut même ajouter qu'elles ne sont guère mieux remplies dans un courant d'eau. Si l'accumulation des microbes dans la masse du liquide est rendue impossible, il n'en est plus de même à la surface des graines: ils se fixent sur leur tégument et le tapissent d'une membrane quelquefois imperceptible à l'œil nu, mais souvent suffisante pour priver l'embryon de l'oxygène qui lui est indispensable.

La question présente plus d'intérêt lorsqu'on place les graines submergées à l'abri des perturbations causées par la prolifération microbienne. On constate encore que la germination ne se produit pas. C'est certainement l'excès d'eau qui empêche l'évolution de la plantule. Mais rien n'autorise à attribuer, *a priori*, ce résultat à la pénurie d'oxygène; on trouve parmi les produits diffusés ou élaborés par la graine des com-

posés organiques, comme les sucres, l'alcool; des matières azotées, parmi lesquels l'ammoniaque; des composés minéraux constitués par de l'acide phosphorique, de la potasse, du fer, etc...

La graine en perdant du sucre, par exemple, se trouve privée de substances capables de lui fournir de l'énergie sans exiger l'intervention de transformations endothermiques. On peut supposer aussi que la perte de matières organiques solubles la met dans l'impossibilité de constituer les diastases dont elle a besoin.

On peut faire la même remarque sur les composés minéraux, car on connaît aujourd'hui, par les travaux de M. G. Bertrand, le rôle important exercé par certains éléments minéraux, comme le manganèse, sur quelques actions diastasiques.

On conçoit donc qu'il n'est pas très prudent d'affirmer, sans examen préalable, que la non-germination des graines submergées est due exclusivement à une aération insuffisante.

Je me propose d'exposer dans ce mémoire les résultats de mes recherches sur ce point tout à fait spécial. J'aborderai également l'étude des conséquences de la submersion des graines sur la conservation du pouvoir germinatif; mais je n'examinerai pas, pour le moment, les actions diastasiques dont les graines ainsi traitées sont le siège, ou tout au moins n'y aurai-je recours que pour faciliter l'interprétation des résultats fournis par l'expérience.

II

Pour bien préciser les causes de la non-germination des graines submergées, il faut établir la part qui revient à la perte d'une partie des matériaux solubles des cotylédons.

Il est facile d'empêcher ces pertes: il suffit en effet d'additionner le liquide ambiant de tous les composés que les graines lui cèdent, et de chercher si les plantules évoluent dans des solutions minérales ou dans des solutions organiques, additionnées ou non de glucose.

Toutes ces précautions étant prises, on constate encore que

les graines restent, en apparence, à l'état de vie latente, exactement comme dans l'eau distillée.

Ce résultat restreint le champ des investigations, et conduit à accorder une attention toute particulière aux échanges gazeux entre les graines et le liquide qui les baigne.

Si l'afflux de l'oxygène vers les cellules cotylédonaires est entravé, la graine est soumise à une asphyxie partielle. Or nous savons par les travaux de MM. Lechartier et Bellamy[1], Pasteur[2], Müntz[3], que les fruits sucrés, les racines de betteraves, les plantes adultes privées d'air produisent de l'alcool.

Il est donc tout indiqué de rechercher la présence de l'alcool dans le liquide qui baigne les graines que je suppose privées de l'oxygène nécessaire à leur développement.

J'ai examiné dans ce but quelques espèces de graines. Le tableau suivant indique quelques-uns des résultats que j'ai obtenus :

Nature des graines.	Durée de l'expérience en jours.	Quantité d'alcool p. 0/0 de poids sec des graines.
Pois	12	4,63
Maïs	9	0,81
Lupin	10	2,28
Arachide	10	0,64

Les graines étaient placées à la température de 22-23°. Les chiffres de la dernière colonne verticale n'ont qu'une valeur qualitative ; ils ne sont pas rigoureusement spécifiques pour les semences auxquelles ils correspondent, car la quantité d'alcool produite dans un temps donné varie avec le volume d'eau qui baigne l'unité de poids de graine, avec la profondeur du liquide et l'étendue de sa surface libre, etc.

Ces résultats semblent confirmer l'hypothèse de la pénurie d'oxygène; mais ils ne permettent pas de formuler une conclusion ferme, puisque la transformation des sucres fermentescibles en alcool et acide carbonique est un phénomène

1. Lechartier et Bellamy, *C. R.* 1869, t. LXIX, p. 356, 466; t. LXXIV, 1872; 1874, t. LXXIX, p. 949 et 1006; 1875.

2. *C. R.* 1872, t. LXXV, p. 789.

3. *C. R.* T. LXXXVI, 1878, p. 49.

diastasique indépendant de l'intervention de l'oxygène gazeux.

Admettons cependant provisoirement la justesse de cette déduction, et essayons d'interpréter le mécanisme de l'asphyxie des graines submergées; l'oxygène arrive par voie de diffusion dans la masse du liquide aux cellules superficielles des cotylédons; là il se trouve absorbé en raison des besoins respiratoires du protoplasma cellulaire; s'il n'est pas entièrement consommé, il pénètre jusqu'aux couches sous-jacentes qui, à leur tour, en absorbent une autre portion, et ainsi de suite jusqu'aux régions les plus profondes; mais si les cotylédons sont trop volumineux, il peut arriver qu'une certaine partie des cellules les plus éloignées de la surface ne reçoive plus d'oxygène, et alors la plantule n'évoluera pas. En somme on conçoit qu'il y ait des graines très petites qui puissent germer dans l'eau distillée stérile, tandis que des graines volumineuses ne germent pas, en admettant, je le répète, que l'aération insuffisante des tissus cotylédonaires soit la cause immédiate des effets que je viens de signaler.

On a là l'image assez exacte de ce qui se produit dans une liqueur organique abandonnée à l'invasion libre des espèces microbiennes. Celles qui consomment l'oxygène gazeux se développent dans les régions superficielles, le plus souvent en formant un voile. Elles interceptent ainsi tout l'oxygène dissous, si bien que dans les parties profondes les cellules anaérobies peuvent se multiplier normalement.

Remarquons maintenant que chez certaines espèces de graines, comme le pois par exemple, la production d'alcool est hors de proportion avec la quantité de sucres solubles contenue dans les graines normales; l'alcool formé peut atteindre 10 pour 100 du poids sec des semences suivant les conditions de l'expérience.

Cela prouve que, malgré la suppression apparente de l'activité vitale dans les graines submergées, la solubilisation et la gazéification des matériaux de réserve s'y poursuivent activement.

Le tableau suivant en donne une idée; les chiffres qu'il renferme ont été obtenus en déterminant les pertes subies par des graines de pois placées dans l'eau distillée pendant un temps variable.

Lots.	Poids sec des graines. mgr.	Durée de l'expérience. Jours.	Perte totale de poids sec. mgr.	Perte 0/0 du poids sec initial.
—	—	—	—	—
N° 1	7,005	6	742	10,58
N° 2	6,081	12	1,054	17,33
N° 3	6,644	27	1,811	27,26

Si on tue les graines en les portant dans l'eau distillée à la température de 100° pendant 5 à 10 minutes, on constate qu'elles cèdent au liquide une quantité de matières solubles beaucoup plus faible que celles qui ont été éliminées par les deux derniers lots du tableau précédent. 20 graines placées dans 40 c. c. d'eau ont laissé diffuser les quantités suivantes de substances sèches :

Lots.	Poids sec des graines. mgr.	Durée de l'expérience. Jours.	Matières sèches diffusées. mgr.	Perte 0/0 du poids sec. Initial.
—	—	—	—	—
N° 1	3745	3	434	11,59
N° 2	4242	10	512	12,06
N° 3	3952	15	499	12,50

Comme on le voit, 100 parties de graines tuées, placées dans l'eau, perdent à peu près 12 parties de matières solubles ; 100 parties de graines vivantes, placées dans un volume à peu près égal d'eau distillée, lui abandonnent des quantités variables avec le temps, mais constamment croissantes, composés gazeux compris.

Voilà ce qui se produit chez les graines amylacées lorsqu'elles sont maintenues sous l'eau à l'abri des microbes. On peut se demander si les phénomènes de dégradation des réserves sont aussi actifs dans les graines oléagineuses placées dans les mêmes conditions.

Si le principe sur lequel on s'est guidé jusqu'à présent doit sortir du domaine de l'hypothèse, on peut prévoir que les matières grasses resteront à peu près intactes.

Les transformations diastasiques dont les graines de pois sont le siège sont dues à des ferments qui n'exigent pas le concours de l'oxygène gazeux. La transformation de l'amidon en glucose se fait par voie d'hydratation : la dislocation des sucres fermentescibles en alcool et acide carbonique, opérée par la zymase, est une réaction indépendante aussi de la présence ou de l'absence de l'oxygène libre.

Les huiles des graines oléagineuses paraissent au contraire exiger l'intervention de l'oxygène libre pour devenir assimilables ; une aération insuffisante des graines aura donc pour conséquence une atténuation des phénomènes qui président à l'assimilation des matières grasses.

C'est là une conclusion facile à vérifier par l'expérience.

D'autre part, si l'on peut constater la germination des graines de faible volume sous l'eau, on aura un argument de plus à l'appui de la même conclusion.

Examinons successivement ces deux questions :

Pour étudier la digestion des matières grasses sous l'eau, j'ai employé des graines d'arachide *(arachis hypogæa)*. Les huiles constituent la presque totalité des réserves ternaires de ces semences; les échantillons que j'ai utilisés renfermaient 53,66 p. 100 de matières solubles dans l'éther sec. Le tableau suivant donne les poids des composés oléagineux retrouvés dans les graines après une submersion plus ou moins prolongée, ainsi que la perte de substances sèches subies dans le même temps.

Lots.	Poids sec des graines normales. mgr.	Durée de la submersion. Jours.	Matières grasses 0/0 du poids initial, à la fin de l'expérience.	Poids final des graines. mgr.	Perte 0/0 de substances sèches.
	—	–	—	—	–
N° 1	10,905	10	52,86	10,065	7,70
N° 2	10,196	29	52,29	9,010	11,63
N° 3	10,551	59	51,98	8,989	14,82
N° 4	11,226	94	»	9,698	14,35 [1]

L'examen de ces chiffres montre que les graines oléagineuses ne se comportent pas de la même façon que les graines amylacées lorsqu'elles sont submergées. La matière grasse demeure à peu près inattaquée, même après un séjour de plusieurs mois sous l'eau. Ce sont les sucres solubles, l'amidon et la matière azotée qui sont consommés presque exclusivement. L'arachide immergée produit de l'alcool (V. p. 352) et on peut ajouter ici que, s'il ne s'en forme que des quantités relativement faibles, c'est parce que les matières grasses restent intactes et ne sont pas transformées en sucres fermentescibles.

1. Les chiffres qui expriment les pertes des trois premiers lots ont été établis en déterminant l'extrait abandonné par les graines au liquide ambiant après une ébullition de 15 à 20 minutes; ce procédé fournit un taux d'extrait trop élevé, ainsi que le montre le lot n° 4, dont l'extrait sec a été établi sans chauffage préalable.

En somme, tous ces faits confirment les prévisions *a priori*.

Il en est de même, ainsi qu'on va le voir, des observations faites sur la germination des graines de faible volume sous l'eau.

Pour suivre leur développement, on peut faire usage de tubes à essai ordinaires, fermés avec du coton. On y introduit 5 c. c. d'eau distillée, et on stérilise à 120°. Les graines, stérilisées préalablement, sont réparties dans ces tubes, à raison de trois ou quatre et quelquefois plus, par tube. J'ai étudié de cette façon des crucifères, comme le chou, le colza, le radis cultivé, la moutarde blanche, des légumineuses, parmi lesquelles la luzerne, le trèfle violet, le lotier (*lotus*).

De toutes ces espèces, c'est le colza qui supporte le mieux la submersion : mais d'une manière générale les crucifères sont beaucoup plus résistantes que les légumineuses.

Avec le colza, on voit poindre les radicules au bout de 3 ou 4 jours à 22°; le cinquième jour elles ont déjà quelques millimètres de longueur. Mais la germination est très irrégulière; sur trois ou quatre graines, une ou deux au maximum évoluent lentement, mais à peu près normalement; chez les autres, la germination débute quelquefois, mais ne se termine pas.

Les graines exposées à l'air libre produisent des tiges de 3 à 4 centimètres au bout de 5 jours.

Les plantules submergées qui germent le mieux atteignent ce développement au bout de 12 jours. Elles présentent des allures qu'il est bon de signaler. Le plus souvent elles nagent entre deux eaux pendant un certain temps, puis les feuilles cotylédonaires atteignent la surface libre du liquide; à partir de ce moment, la plante se développe vite; la racine atteint le fond du tube et y prend un point d'appui, les feuilles séminales sortent du liquide, puis la germination s'achève en quelques jours.

Le tissu des feuilles submergées est lacunaire, et c'est grâce à cette adaptation à la vie aquatique que la plantule peut se constituer une atmosphère interne dans laquelle elle puise son oxygène. De plus, les bulles de gaz emprisonnées dans les lacunes font fonction de flotteurs, et la plante se rapproche de la surface libre du liquide.

Les graines de chou germent aussi sous l'eau, mais elles flottent très rarement dans le liquide. Par contre, les cotylédons

s'élargissent démesurément, de sorte que la surface de diffusion de l'air dissous est augmentée dans une très grande proportion. D'une manière ou de l'autre, quelques plantules finissent par sortir du liquide pour achever rapidement leur germination.

Les graines de moutarde blanche et de radis cultivé sortent avec beaucoup plus de difficulté.

Les graines de légumineuses manifestent également un commencement d'évolution : mais la germination ne s'achève jamais; je tâcherai d'en donner la raison plus loin.

Ce n'est pas tout; dans un tube contenant 3 ou 4 graines, une seule plantule se développe à peu près bien, une deuxième la suit avec beaucoup de retard : mais quand la première s'est épanouie dans l'air et qu'elle ne demande plus par conséquent au gaz dissous l'oxygène nécessaire à son développement, la seconde évolue aussi et sort à son tour du liquide.

Plus les graines sont nombreuses dans un même tube, plus lente est l'évolution des plantules; dans un tube pourvu de 36 graines de colza, aucune ne manifeste le moindre symptôme de germination au bout de 22 jours; dans un autre qui en renferme 16, 6 présentent à la même époque des tigelles de 5 à 10 millimètres de longueur.

De tous ces faits on peut tirer les conclusions suivantes :

1° L'oxygène dissous est incapable de subvenir aux besoins des graines placées dans les conditions les plus favorables à la germination;

2° Les petites graines qui germent dans l'eau distillée se constituent en quelque sorte une atmosphère interne, ce qui tend à montrer que l'oxygène libre seul peut circuler assez rapidement dans ces tissus profonds pour empêcher leur asphyxie;

3° La vitesse de dissolution de l'oxygène n'est pas assez grande pour permettre à ce gaz d'alimenter un grand nombre de graines dans un petit volume de liquide, ou des graines volumineuses placées dans des volumes d'eau aussi élevés que l'on veut.

III

Toutes les expériences précédentes résolvent la question, mais d'une manière indirecte en quelque sorte. Un procédé de démonstration directe consisterait à fournir à la plantule de l'oxygène gazeux au sein du liquide.

On peut y arriver de deux façons différentes, soit en opérant sur des plantules pourvues de chlorophylle, soit en fournissant de l'eau oxygénée aux graines submergées.

Les plantes pourvues de chlorophylle décomposent l'acide carbonique sous l'eau; l'oxygène mis en liberté s'accumule dans les lacunes et les vacuoles, de sorte que la plantule possède ainsi une atmosphère oxygénée; mais l'asphyxie agit pendant la nuit, et c'est elle qui l'emporte, car les plantes recouvertes seulement de quelques millimètres d'eau ne peuvent pas en sortir. Le seul résultat que j'aie pu obtenir consiste dans une prolongation de la vie chez les plantules, si on les compare à d'autres dépourvues de chlorophylle et traitées de la même façon.

L'emploi de l'eau oxygénée ne conduit pas non plus à des résultats satisfaisants.

J'ai placé 5 lots de 10 pois dans de l'eau stérilisée par filtration à travers une bougie Chamberland et additionnée de quantités variables d'eau oxygénée. Chaque lot était placé dans 50 c. c. de liquide capable de dégager les volumes suivants d'oxygène gazeux.

Lots.	Oxygène total disponible c.c.	Oxygène disponible par graine. c.c.
N° 1	600	60
N° 2	300	30
N° 3	180	18
N° 4	120	12
N° 5	0	0

Les graines du lot n° 1 flottent au bout de quelques heures dans le liquide; le dégagement d'oxygène est si abondant que les téguments éclatent au bout de quelque temps; mais les germes n'ont pas poussé.

Dans les lots nos 2, 3 et 4, les racines percent le tégument au bout de 20 heures; dans le nº 5, elles apparaissent au bout de 36 heures. Il y a donc une action manifeste de la part de l'eau oxygénée; mais les racines, au lieu de s'allonger normalement, s'enroulent en spirale, ce qui prouve bien que l'oxygène naissant dégagé en abondance exerce en même temps une influence nocive sur la germination. Après 48 heures, le lot nº 4 présente une avance visible sur le lot nº 3, celui-ci sur le nº 2; tous trois conservent le pas sur le nº 5. Cependant, soit que l'influence nocive de l'eau oxygénée, établie par la marche du nº 1, l'emporte sur son action bienfaisante, soit au contraire qu'il n'y ait pas assez d'oxygène, la germination ne se poursuit pas.

Il apparaît néanmoins clairement que la présence d'oxygène libre a imprimé une action énergique au développement de l'embryon.

IV

Puisque les graines submergées sont soumises à une asphyxie lente, on doit rechercher quelles sont les conséquences de ce traitement sur la vitalité de l'embryon, autrement dit sur la conservation du pouvoir germinatif des semences.

Ce problème présente un certain intérêt agricole : les graines confiées à un sol saturé d'eau sont placées à peu près dans les mêmes conditions que celles qu'on plonge au sein de l'eau. Il est intéressant aussi au point de vue de la physiologie végétale, car sa solution permettra de donner une explication rationnelle de la vitalité des graines sauvages répandues sur la terre par la végétation spontanée.

Expérimentalement il est très facile à résoudre. Il suffit en effet de placer les graines sur un tampon de coton appliqué sur le fond d'un tube à essai d'assez grande dimension, s'il s'agit de graines volumineuses, et de les recouvrir de 4 à 5 centimètres d'eau pendant un temps variable. On remonte le coton à la surface de l'eau au moment voulu; on expose ainsi les graines à l'air, et on observe ce qui se passe.

La germination de graines de pois traitées de cette façon se produit déjà avec un retard manifeste sur des graines normales

après quatre jours de submersion : le développement de la plantule est très pénible au début : mais elle surmonte cet état de malaise au bout de trois ou quatre jours et donne naissance à une plante normale.

Après huit jours de submersion, l'embryon se développe encore, mais très lentement; il est quelquefois impossible de distinguer, dans le tissu qui prend naissance, la moindre forme de foliole, de tige ou de racine. Parfois l'embryon n'évolue pas, et la graine, après quelques jours de repos apparent, forme des racines normales, longues et ramifiées qui partent des pétioles des cotylédons. On a ainsi toutes les manifestations possibles d'un végétal malade.

Quelques graines font preuve d'une résistance particulière; on en rencontre, mais très rarement, qui se développent normalement après huit jours de submersion. Après douze jours, on peut considérer les embryons comme morts, mais non les cellules cotylédonaires, dans lesquelles la solubilisation et la gazéification se poursuivent encore pendant longtemps (v. p. 356).

On observe les mêmes phénomènes dans les solutions minérales avec ou sans sucre.

Le maïs est plus résistant; il peut supporter une submersion de plusieurs jours sans trahir le moindre trouble physiologique. Passé ce laps de temps, on remarque que le retard de la germination s'accentue rapidement : après vingt jours de séjour sous l'eau les embryons sont tués.

Les graines de colza et de chou résistent encore plus longtemps : ce n'est guère qu'après un mois de submersion que le pouvoir germinatif commence à s'atténuer. Au bout de deux mois, les plantules qui se développent sont chétives et difformes : beaucoup de graines ne germent pas.

Les graines de luzerne, de lotier, de trèfle font preuve d'une résistance moins grande que les graines de crucifères. D'une manière générale on peut dire que les semences à réserves amylacées perdent leur faculté germinative beaucoup plus vite que les graines oléagineuses de volume à peu près égal.

Ces faits étant constatés, il s'agit maintenant d'en découvrir les causes. J'ai montré que l'alcool s'accumule dans le liquide qui baigne les graines ; mais on ne peut pas lui attribuer la

mort des embryons lorsque les graines sont réparties à raison de une ou deux dans des tubes à essai qui renferment 10 c. c. d'eau distillée. Les semences doivent produire d'autres composés encore plus toxiques ; c'est leur présence qu'il faut mettre en évidence.

Dans ce but, il suffit de faire séjourner des graines dans l'eau distillée et de répartir ensuite la liqueur obtenue dans des tubes à essai préalablement stérilisés, dans lesquels on fera germer les graines normales stérilisées. J'ai employé une liqueur obtenue en faisant séjourner, pendant un temps variable, 100 pois dans 100 c. c. d'eau distillée, à la température de 22°.

La germination s'effectue lorsqu'on fait usage d'une liqueur obtenue par un contact de huit jours avec les pois ; mais elle présente un retard considérable sur le développement des plantules qui végètent dans l'eau distillée.

L'apparition de la radicule se fait en 48 heures ; son développement s'arrête dès qu'elle plonge de 1 ou 2 centimètres dans la liqueur. La tige continue de pousser lentement ; puis, au bout de plusieurs semaines, des racines secondaires partent de la base de l'axe principal avorté, envahissent tout le liquide, et la germination va jusqu'à l'épuisement à peu près complet des cotylédons.

Dans une liqueur qui est restée 12 jours en contact avec les graines, la germination s'arrête définitivement dès que la radicule atteint environ 1 centimètre de longueur.

On peut se demander si l'action de la solution précédente est spécifique, c'est-à-dire sans action sur la germination des espèces de graines différentes de celle qui l'a fournie. Les agronomes connaissent en effet cette particularité des légumineuses en général, qui rend impossibles plusieurs cultures successives d'une même espèce sur un même terrain, malgré tous les soins que l'on apporte à la restitution des éléments enlevés au sol par les premières récoltes.

Les uns attribuent ce fait à la multiplication rapide des parasites des racines, en particulier des anguillules.

D'autres accordent plus d'importance à des excrétions nuisibles des racines, qui, en s'accumulant dans le sol à la suite de quelques récoltes successives, gênent le développement de la plante, et provoquent ainsi un abaissement dans le rendement des cultures.

L'action de la liqueur obtenue par la submersion des pois relève évidemment de la théorie des excrétions ; mais elle agit aussi sur le maïs, dont elle retarde beaucoup le développement sans toutefois l'empêcher, et sur la moutarde blanche qui y reste absolument inerte.

Cette liqueur renferme donc un produit très toxique pour des graines très éloignées des espèces qui l'ont élaboré, ce qui n'infirme d'ailleurs, ni ne confirme aucune des deux hypothèses précédentes.

On ne peut pas incriminer l'alcool ; la liqueur n'en renferme pas 1 0/0.

J'ai constaté que le composé en question n'est pas toxique pour les moisissures, en particulier pour l'*aspergillus niger* qui le détruit facilement. Si on répand en effet quelques spores de cette mucédinée sur des pois ramenés à l'air après une submersion de huit jours, incapables par conséquent de germer normalement, on remarque que la tige s'allonge assez vite dès que le mycélium a envahi les cotylédons, si toutefois l'embryon n'est pas mort ; il faut donc admettre que la moisissure a brûlé les produits nocifs accumulés dans la graine.

On est conduit également à supposer que ces produits sont volatils, et voici pourquoi : on se rappelle que les graines normales germent dans un liquide qui a reçu les excrétions de 100 graines de pois pendant huit jours ; j'ai dit également que la racine principale ne s'allonge plus dès qu'elle plonge de quelques millimètres dans la solution ; mais les racines secondaires, développées plusieurs jours après, envahissent le liquide sans trahir aucune action nocive de sa part ; les produits ont donc disparu probablement par évaporation lente.

Il est facile d'établir par une expérience directe la volatilité de la substance en question : on distille à moitié 60 à 80 c. c. de la liqueur obtenue en plaçant 100 pois dans 100 c. c. d'eau distillée pendant 12 jours. On ramène ensuite au volume primitif par addition d'eau distillée stérile, et on répartit dans des tubes à essai flambés et fermés au coton.

On chauffe, d'autre part, au bain-marie à 100°, un volume à peu près égal de la même liqueur dans un ballon scellé pendant toute la durée de la distillation ; on laisse refroidir et on répartit également en tubes flambés. Cette liqueur renferme tous les

produits volatils élaborés par les pois ; la première en est à peu près privée.

On fait germer des graines normales dans des tubes ainsi préparés. Elles se développent sur la liqueur distillée, quoique avec un retard prononcé sur celles qui germent dans l'eau pure ; celles qui sont placées sur la liqueur chauffée en ballon scellé donnent naissance à une racine d'environ 1 centimètre, et la germination s'arrête. On a donc éliminé par distillation la presque totalité des composés capables d'entraver le développement des plantules.

Si l'on recherche, par voie de déduction, quelle est la nature des produits volatils qui apparaissent dans la liqueur ainsi obtenue, on est conduit à penser que l'aldéhyde éthylique doit figurer parmi eux.

L'aldéhyde est un antiseptique ; elle est très volatile ; elle est susceptible d'être brûlée par les moisissures lorsqu'elle n'est pas trop concentrée ; sa formation au sein des cellules vivantes est possible, puisque celles-ci produisent de l'alcool.

Pour la caractériser, j'ai fait usage de la fuchsine décolorée par l'acide sulfureux, préparée suivant les indications de M. U. Gayon. On stérilise par le sublimé 100 graines de pois et on les place dans 100 c. c. d'eau distillée, stérilisée à 120° pendant quelques jours. On distille le tout dans des tubes à essai jaugés de 40 c. c., dans lesquels on introduit préalablement 5 c. c. de fuchsine décolorée ; on les maintient dans la glace fondante jusqu'à ce que, par distillation, on ait complété les 40 c. c. On constate ainsi que la fuchsine rougit très nettement sous l'influence des produits qui ont passé à la distillation ; la liqueur primitive renferme donc de l'aldéhyde, qui s'y trouve même en quantités dosables ; le même procédé permet de la déterminer facilement au 1/2 milligramme, il suffit de faire usage d'une échelle colorée préparée avec une solution d'aldéhyde pure de titre connu. Voici les chiffres trouvés dans des liqueurs obtenues en maintenant 100 grammes de pois dans 100 c. c. d'eau distillée pendant des temps variables à la température de 22° ;

Lots de graines.	Durée de la submersion. Jours.	Quantité d'aldéhyde produite. mgr.
1	3	2
2	5	6,6
3	7	8,25

Si d'autre part on place 100 graines tuées à l'ébullition pendant 10 minutes dans 100 c. c. d'eau renfermant 1 c. c. 5 d'alcool, on constate qu'à la même température de 22°, et pendant le même temps, la quantité d'aldéhyde formée est insignifiante. La transformation de l'alcool en aldéhyde est un phénomène d'oxydation que les graines vivantes activent[1].

1. Les faits déjà acquis nous permettent d'examiner le sort des graines confiées au sol ou répandues spontanément à sa surface.

On sait que les cultivateurs se refusent toujours à faire les semailles pendant que la terre est gorgée d'eau ; cette terre n'est pas saine, et la levée des graines se ferait très mal. Il suffit de rappeler que les semences incorporées au sol dans ces conditions sont placées dans une situation à peu près identique à celles que j'ai soumises à la submersion, pour comprendre qu'elles sont condamnées à périr au bout de quelques jours.

On peut même ajouter qu'une sécheresse qui surviendrait immédiatement après l'ensemencement serait impuissante à prévenir le mal, car les espèces microbiennes du sol se chargent de l'accomplir. Les graines turgescentes placées dans une terre saturée d'eau laissent diffuser une partie de la substance soluble qu'elles renferment ; chaque semence constitue donc un centre d'alimentation pour les microorganismes ; ceux-ci ne tardent pas à l'enfermer dans une membrane vivante plus ou moins complète, suffisante pour intercepter l'accès de l'oxygène nécessaire à la germination. L'asphyxie peut donc se poursuivre dans un sol même ressuyé ; la graine ne tarde pas à mourir.

Les semailles ne peuvent donc se faire que dans un sol bien ressuyé, bien ameubli, dans lequel les semences, tout en trouvant un taux d'humidité suffisante, pourront conserver le contact immédiat avec l'air qui remplit les vides laissés par les particules terreuses.

Les graines des plantes sauvages répandues en été et en automne à la surface de la terre peuvent conserver leur pouvoir germinatif jusqu'au printemps suivant, à la faveur de la sécheresse ou des basses températures de l'hiver qui arrêtent le travail des diastases. Celles qui, à cette époque, sont placées dans des conditions favorables à la germination se développent ; mais celles qui ont été enfouies par les labours effectués en hiver se trouvent comme encastrées par le tassement dans les particules terreuses. La germination devient alors impossible, car l'oxygène qui circule dans les espaces libres du sol ne peut pas pénétrer au centre de ces particules ; les microbes aérobies l'interceptent ; la vie anaérobie y est seule possible. Les graines enfouies dans un sol tassé sont placées dans des conditions qui rappellent, au point de vue de l'air, celles qui sont réalisées sous l'eau ; lorsque la température estivale permettra aux diastases de dissoudre les aliments de réserve, elles seront soumises à une asphyxie lente. Quelques mois de ce régime et elles ne pourront plus germer même au contact de l'air.

Les exemples de longévité des graines enfouies rapportés dans les manuels de physiologie végétale ont été recueillis à la suite d'observations trop superficielles. Si l'on a vu des graines de moutarde germer dans des tranchées profondes récemment ouvertes, dans un sol qui n'avait pas été exposé à l'air depuis des années ; si l'on a remarqué que la digitale apparaît à la suite des travaux analogues dans des régions où elle était absente, ce n'est pas parce que les graines enfouies attendaient leur mise au jour pour germer, mais tout simplement parce que les outils ou les chaussures des terrassiers les y avaient transportées.

On trouve également de l'aldéhyde dans le liquide qui baigne des plantules de pois submergés. J'ai déjà montré que les plantules ainsi traitées forment de l'alcool (*C. R.*, t. CXXVIII, p. 1608). Cet alcool est oxydé dans des proportions assez grandes C'est ainsi que huit plantules de pois, âgées de huit jours, placées sous l'eau pendant quinze jours, ont produit 10,5 milligrammes d'aldéhyde.

Des cotylédons privés de leurs embryons, disposés sur des perles de verre imbibées d'eau, en produisent aussi des quantités sensibles.

Si l'on rappelle que les corps poreux, comme la mousse de platine, le charbon pulvérulent, possèdent la propriété de transformer l'alcool en aldéhyde en présence de l'air, on peut faire observer avec raison que les graines des pois oxydent l'alcool suivant le même mécanisme; mais il est cependant incontestable que leur qualité d'êtres vivants leur permet d'imprimer au phénomène une impulsion qu'on n'observe plus lorsqu'on fait agir des graines tuées.

Est-ce une action d'ordre purement chimique, ou bien est-on en présence d'un processus physiologique normal? En d'autres termes, la transformation de l'alcool en aldéhyde s'accomplit-elle sous l'influence d'une diastase oxydante qui a sa place marquée au nombre de celles que la cellule vivante met en jeu? L'examen de cette question sort du cadre que je me suis imposé dans ce mémoire.

Je me contenterai d'exposer ici quelques arguments en faveur de cette dernière hypothèse, ce qui ne veut pas dire que je considère le problème résolu.

Considérons d'abord ce qui se passe dans les graines oléagineuses soumises à la submersion. Les huiles qui sont solubilisées en quelques jours par voie d'oxydation dans les graines qui germent normalement restent intactes sous l'eau, parce que l'oxygène dissous est insuffisant pour effectuer cette transformation. Il apparaît donc clairement que les diastases fixatrices d'oxygène ne peuvent remplir leur rôle dans la profondeur du liquide.

D'une manière générale, la dégradation d'une substance sous l'influence de diastases s'arrête au terme dont l'élaboration ultérieure exige l'intervention d'une oxydase.

J'ai démontré d'autre part que la germination des graines ne peut s'accomplir, précisément à cause de l'inertie de ces diastases.

C'est dire que le terme alcool, composé doué de peu d'affinités chimiques, auquel s'arrête la dégradation des hydrates de carbone, doit subir une oxydation ultérieure, et se transformer en aldéhyde, composé qui possède une puissance de combinaison remarquable.

Tout se passe donc comme si la croissance de la plantule était la résultante d'un certain nombre d'actions diastasiques dont l'équilibre ne saurait être rompu à aucun moment de la vie du végétal. En particulier, la privation partielle d'oxygène gazeux le condamne à périr d'asphyxie par l'accumulation de produits toxiques qui, dans les conditions normales, n'apparaissent que d'une façon transitoire et ne sont pour ainsi dire jamais libres dans le protoplasma cellulaire[1].

La transformation de l'alcool en aldéhyde, en admettant qu'elle constitue un acte physiologique, n'infirme nullement les résultats que j'ai exposés dans la note des *C. R.*, t. CXXX, p. 424. Au contraire, on ne comprend pas bien comment l'alcool peut être utilisé par la plante, tandis que la formation transitoire d'aldéhyde fait tomber toutes difficultés d'interprétation. Le rapport du poids de plantule élaboré au poids perdu par les cotylédons reste toujours égal à 1/2, car la perte de deux atomes d'hydrogène de l'alcool ne l'affecte que dans une proportion insignifiante.

Il y a plus; la dislocation des sucres fermentescibles en alcool et acide carbonique nous donne bien un des termes du quotient respiratoire; mais l'absorption d'oxygène ne nous était pas apparue jusqu'à présent, du moins dans les graines amylacées. Or la formation d'aldéhyde prouverait que l'absorption de l'oxygène se ferait dans un rapport tel, que le quotient respiratoire ne pût être qu'égal à l'unité, ce que l'expérience a démontré maintes et maintes fois. Il est vrai que les graines amylacées renferment aussi des matières azotées dont la dégradation

1. La germination des graines de colza et de luzerne sous l'eau vient à l'appui de cette conception. Dans les premières, les matieres grasses sont oxydées lentement; la production d'alcool qui exige la formation préalable de glucoses est donc lente aussi, de sorte que l'oxygène dissous peut l'oxyder à mesure qu'il prend naissance; l'équilibre des actions diastasiques se maintient. Dans les graines de luzerne qui sont amylacées, la production d'alcool va plus vite que la consommation, l'équilibre est détruit, il y a accumulation du résidu de la dégradation des réserves dans le liquide ambiant; l'asphyxie est plus lente que dans les graines volumineuses comme le pois, mais plus rapide que dans les graines oléagineuses de volume correspondant comme le colza.

doit influer sur les échanges gazeux, bien qu'on ne l'ait pas encore démontré jusqu'ici.

Si l'on remarque en effet que l'azote se concentre de plus en plus dans les résidus azotés de la digestion, au nombre desquels figure l'ammoniaque, on est obligé d'admettre que ce travail s'accompagne de la mise en liberté de résidus ternaires que les diastases transforment ensuite dans un sens déterminé par leur nature. Ainsi on peut très bien admettre que l'acide de la leucine, par exemple, puisse être transformé en un sucre en C^6 comme les acides gras des huiles.

Je dois rappeler enfin que l'analyse des végétaux entiers a montré que le rapport de l'hydrogène à l'oxygène qui font partie de la plante n'est pas le même que dans l'eau, bien qu'elle soit formée exclusivement à partir des hydrates de carbone fournis par la fonction chlorophyllienne, et des éléments minéraux empruntés au sol. Ce rapport est plus grand que 1/8.

On ignore la raison de ce fait; si l'on considère l'aldéhyde comme étant le noyau des sucres que le protoplasma vivant incorpore à sa substance, on en a tout de suite l'explication. La plante peut même élaborer une certaine quantité de substances chez lesquelles le rapport H/O est plus petit que 1/8, sans altérer le sens des indications fournies par l'analyse.

Mais, je le répète, toutes ces considérations ne sauraient prévaloir contre une expérience directe.

CONCLUSIONS

La non germination des graines submergées est due à une insuffisance d'aération.

Les graines, tout en paraissant conserver l'état de vie latente, lorsqu'elles sont placées sous l'eau, sont le siège de transformations diastasiques nombreuses. Les diastases hydrolysantes en particulier et la zymase conservent une activité comparable à celles qu'elles déploient dans les semences qui germent normalement.

Par contre, les diastases oxydantes ne peuvent pas produire au sein d'un liquide les oxydations que nécessite l'élaboration des aliments de réserve, et c'est pour cela que les embryons de plantules restent inertes.

Si les graines sont petites comme les graines de crucifères par exemple, elles peuvent se développer lentement en se constituant une atmosphère interne dans laquelle elles puisent l'oxygène nécessaire à la respiration.

Les graines amylacées perdent rapidement leur pouvoir germinatif sous l'eau; les graines oléagineuses sont plus résistantes; mais rien n'autorise à admettre que les semences d'une espèce végétale quelconque résistent longtemps à ce mode de traitement.

L'atténuation de la vitalité des germes dans les graines submergées est due à l'accumulation de produits toxiques, en particulier de l'aldéhyde, dans le liquide ambiant.

Tous les faits observés montrent que le développement de la plante, aux dépens des réserves séminales, semble être la résultante d'un certain nombre d'actions diastasiques, dont l'équilibre ne peut jamais être troublé sans causer la mort, à bref délai, du végétal.

On a vu par quel moyen on peut le rompre en entravant l'accès de l'oxygène.

La température est un facteur sur lequel on peut agir avec une précision plus grande encore; il serait intéressant aussi d'étudier l'action d'une température élevée sur la marche de la nutrition. A une température très basse, on peut prévoir que les dégagements gazeux cessent sans que la vie soit détruite, puisque les échanges gazeux ne traduisent que des actions diastasiques. Ceci a été démontré d'ailleurs; on peut prévoir également que la sécheresse absolue doit conduire au même résultat.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

Le Gérant : G. Masson.

14me ANNÉE JUIN 1900 N° 6

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

SUR LES CYTOTOXINES

Par M. ÉLIE METCHNIKOFF

Sous le nom de cytotoxines, je propose de désigner ces poisons des éléments figurés, poisons d'origine animale, qui ont dans ces derniers temps attiré l'attention générale des pathologistes. Et cependant leur découverte première est déjà assez ancienne. A l'époque où l'on essayait la transfusion à l'homme du sang ou du sérum de divers mammifères, notamment de mouton, on s'est aperçu du danger de cette intervention, à cause de l'action dissolvante de ces humeurs sur les globules du sang humain. Les praticiens avaient signalé des accidents très graves, souvent mortels, comme la coagulation du sang dans les vaisseaux, la formation des thrombus et des infarctus dans les poumons, l'extravasation sur des séreuses, etc. Les pathologistes, notamment Panum, Ponfick, Hayem, Landois établirent comme cause de ces phénomènes la dissolution des hématies et des leucocytes d'homme par le sang d'espèce étrangère. La pratique de la transfusion du sang animal à l'homme a dû être abandonnée [1], et, avec elle, la découverte des premières cytotoxines, faite il y a plus de vingt-cinq ans, a été presque complètement oubliée.

L'étude de ces poisons ne fut reprise qu'à la suite des recherches sur la propriété microbicide du sérum sanguin de différents animaux. Il y a déjà plus de dix ans [2] que j'avais signalé l'analogie entre ce pouvoir microbicide des sérums et leur propriété de dissoudre les globules rouges du sang, mais ce sont surtout

1. L'histoire de cette période se trouve résumée dans une brochure de M. Ziemssen, dans *Klinische Vortrage*, 1887.
2. Ces *Annales* 1889, p. 669.

MM. Daremberg[1] et Buchner[2] qui attirèrent l'attention des savants par leurs recherches sur ce sujet. Ils ont démontré que la destruction des bactéries et des globules rouges par les sérums suit les même lois et s'opère par le même mécanisme. M. Buchner ajouta encore des faits nouveaux sur la destruction des leucocytes par des sérums sanguins d'espèces étrangères.

Les lignes qui précèdent se rapportent exclusivement aux poisons globulaires qui sont naturellement contenus dans les divers sérums. La découverte des cytotoxines artificielles ne fut faite que beaucoup plus tard. Dans une petite publication de MM. Belfanti et Carbone[3], qui ne remonte qu'au mois de juillet 1898, il est pour la première fois question d'une substance toxique qui se développe dans les sérums sanguins des animaux, traités avec du sang d'espèce étrangère. Ainsi le sérum d'un cheval, auquel on avait injecté dans le péritoine une forte quantité de sang de lapin, est devenu très toxique pour ce rongeur. Le sérum du chien, traité avec du sang de lapin, acquiert pour cette espèce un pouvoir toxique encore plus prononcé. MM. Belfanti et Carbone ont établi que ces sérums ne deviennent très toxiques que pour les espèces qui avaient fourni le sang à injecter, qu'ils sont très peu toxiques pour des espèces tierces, et pas du tout toxiques pour l'espèce animale qui fournit le sérum. Ces auteurs ne se prononcent pas sur la cause de cette toxicité. Indépendamment des observateurs italiens, M. J. Bordet, de l'Institut Pasteur, a commencé ses études dans l'été de 1898 ; il a pu facilement constater que le sérum sanguin d'un animal (cobaye). injecté avec du sang d'espèce étrangère (lapin), acquiert la propriété de dissoudre les globules rouges du lapin, et, grâce à ce pouvoir cytotoxique, devient un poison très violent pour ce rongeur.

M. Bordet a établi en outre que l'analogie entre la propriété microbicide et le pouvoir hémolytique du sérum des animaux préparés est très profonde, car dans les deux cas il s'agit de poisons spécifiques, constitués par deux substances qui concourent à la même œuvre. Tandis que le premier des deux

1. *Archives de médec. expérim.* 1891, p. 720.
2. *Archiv. f. Hygiene.* T. XVII.
3. Produzione di sostanze tossiche nel siero di animali inoculati con sangue eterogeneo, *Giornale della R. Acad. di med. di Torino*, 1898, n° 8.

poisons (l'alexine) est préformé chez l'animal normal, le second (substance sensibilisatrice) se produit pendant le traitement avec du sang d'espèce étrangère ou bien avec des produits bactériens.

La théorie des deux substances qui se réunissent pour former le poison des hématies et des bactéries est actuellement admise d'une façon générale. Elle l'est aussi en Allemagne, où elle a été d'abord acceptée et développée par MM. Ehrlich et Morgenroth dans leurs trois mémoires très remarquables sur l'hémolyse[1]. Le fait fondamental, établi par ces savants, est la fixation énergique de la substance sensibilisatrice, désignée par eux sous le nom de « Zwischenkörper », ou substance intermédiaire, par les hématies. C'est cette substance qui par elle-même est incapable de dissoudre les globules rouges, mais qui, grâce à son affinité avec ces éléments d'un côté et le ferment hémolytique, ou « complément » (alexine), de l'autre, amène la dissolution des hématies. MM. Ehrlich et Morgenroth ont même pu trouver une certaine quantité de ce complément dans le sérum de certains animaux normaux, non préparés par des injections de sang. Dans leur troisième mémoire qui vient de paraître, ces auteurs recherchent s'il est possible d'obtenir une action hémolytique du sérum des animaux, préparés non plus avec du sang d'espèce étrangère, mais avec du sang de la même espèce et du même individu. Ils ont pu constater que des injections répétées de sang de chèvre (sang avarié par son mélange avec de l'eau) à des chèvres, amènent la production d'un sérum hémolytique, capable de dissoudre les hématies des chèvres différentes de celles qui fournissent le sérum. Ils concluent à la possibilité d'obtenir des « Isolysines », c'est-à-dire des toxines qui dissolvent les globules rouges d'autres individus de la même espèce. Par contre, ils n'ont jamais pu préparer une « Autolysine », poison capable de dissoudre les hématies de chèvre, injectée avec du sang de la même ou d'une autre chèvre. A la fin de leurs deux derniers mémoires, MM. Ehrlich et Morgenroth concluent à une très grande complexité des phénomènes de production des hémolysines, ce qui ne leur permet pas d'arriver à une conclusion précise ni définitive sur ce phénomène.

1. *Berliner klinische Wochenschrift*. 1899. N°s 1 et 22; 1900. N° 21.

Il était facile de prévoir que l'hémolysine, produite à la suite d'injections, n'est pas la seule cytotoxine qu'on puisse obtenir artificiellement. Aussi, dans un article sur l'atrophie sénile, rédigé bientôt après le premier mémoire de M. Bordet et publié (en russe) en février 1899[1], nous avons émis cette supposition qu'il doit être possible de préparer des cytotoxines spécifiques contre toute sorte d'éléments figurés, et que ces poisons artificiels pourraient rendre des services pour régulariser les fonctions cellulaires anormales. Cette idée s'imposait pour ainsi dire comme conclusion naturelle de la découverte de l'hémolysine artificielle, de sorte qu'il n'y a rien d'étonnant qu'elle soit venue simultanément à l'esprit de plusieurs chercheurs.

En effet, bientôt après notre publication, M. Landsteiner annonça la découverte de la spermotoxine dans le sérum de lapins soumis à des injections de spermatozoïdes de taureau, et M. de Dungern publia la description d'une toxine artificielle qui immobilise les cils vibratiles de l'épithélium de la trachée de bœuf, toxine obtenue par un procédé analogue.

Actuellement, en dehors de l'hémotoxine (ou hémolysine), on a déjà obtenu la spermotoxine[2], la trichotoxine[3], la leucotoxine[4] et la néphrotoxine[5], préparées toujours d'après la même méthode, c'est-à-dire par des injections des cellules correspondantes. On a rencontré plus de difficultés dans la préparation de la névrotoxine, mais les essais, entrepris dans mon laboratoire, ont fini par aboutir à un résultat assez satisfaisant dans cette voie.

Les premières recherches sur les cytotoxines ont fait ressortir le caractère spécifique de ces poisons. L'hémotoxine dissout les globules rouges, mais n'attaque pas les autres cellules de l'organisme. D'un autre côté, le poison préparé avec le sang d'une espèce animale, est actif pour les hématies de cette dernière. Et cependant il y a des exemples assez nombreux, où l'hémotoxine s'est montrée plus ou moins efficace sur les hématies des espèces tierces, mais toujours son activité a été moindre

1. *Archives russes de pathologie.* Février 1899.
2. Landsteiner, *Centralb. f. Bacteriol.* 1899.
3. V. Dungern, *Münch. med. Woch.* 1899.
4. Metchnikoff, Ces *Annales* 1899; Delezenne, *C. R. Ac. Sc.* 1900. 2. IV; Funk, *Centr. f. Bacter.* 1900.
5. Lindemann, Ces *Annales* 1900.

que vis-à-vis des globules rouges de l'espèce qui a fourni le sang pour les injections. D'un autre côté, comme ceci résulte des dernières expériences de MM. Ehrlich et Morgenroth, un sérum hémolytique peut n'être actif que pour certains individus d'une espèce, mais non pour tous.

Le regretté Moxter, dans son étude sur la spermotoxine, s'est élevé contre l'idée de la spécificité des cytotoxines. D'après lui, la substance qui tue les spermatozoïdes de mouton est celle qui dissout aussi les hématies de cette espèce. Moxter est arrivé à cette conclusion en constatant que le sérum spermotoxique de lapins, traités avec l'épididyme des moutons, acquiert un certain pouvoir hémolytique. Il voit une preuve décisive en faveur de son opinion dans la circonstance que les spermatozoïdes, ajoutés au sérum actif, lui enlèvent une partie de son pouvoir hémolytique. Une cytotoxine artificielle agirait donc contre deux éléments figurés de nature aussi diverse que les spermatozoïdes et les hématies.

Comme il est très important de se faire une idée exacte sur le caractère spécifique des cytotoxines, et comme l'opinion de M. Moxter se trouve en parfait désaccord avec l'ensemble des faits acquis sur les cytotoxines, j'ai voulu étudier cette question à l'aide d'expériences personnelles. Malgré toutes les précautions, il est impossible de recueillir du contenu des épididymes des moutons sans aucun mélange de sang. On injecte donc inévitablement avec le sperme une certaine quantité d'hématies, qui peuvent et doivent même provoquer la production de l'hémolysine. Par contre, il est très facile d'éviter les spermatozoïdes, en n'injectant que du sang défibriné de mouton à des lapins. Si l'hémolysine est le même poison qui tue les spermatozoïdes, comme le pense M. Moxter, le sérum de lapins, préparés avec du sang de mouton, devra acquérir une toxicité vis-à-vis des éléments mâles.

L'expérience, plusieurs fois répétée, a démontré l'inexactitude de cette supposition. Le sérum hémolytique de lapin, qui dissout les hématies de mouton en peu de temps, n'immobilise pas les spermatozoïdes de ce ruminant, plus vite que le sérum de lapins neufs, dépourvu de toute action hémolytique. Bien plus, dans les trois expériences que j'avais faites, les spermatozoïdes de mouton ont gardé plus longtemps leur mobilité dans

le sérum hémolytique des lapins, préparés par des injections de sang de mouton, que dans le sérum de lapin neuf. Il se produit donc chez ce rongeur une hémolysine, tout à fait distincte de la spermotoxine, contrairement à l'opinion de Moxter. La spécificité des cytotoxines dans leur action vis-à-vis des catégories particulières d'éléments figurés est donc un fait général qui ne doit plus être méconnu.

Dans un travail sur la résorption des cellules[1], j'ai exprimé l'opinion que les deux parties constituantes des cytotoxines sont liées aux phagocytes, et représentent les ferments de la digestion intracellulaire. Mais, tandis que les alexines sont contenues dans l'intérieur de ces cellules et ne s'en échappent que dans des cas particuliers, lorsqu'il se produit une avarie des phagocytes, ou « phagolyse », la substance intermédiaire (ou sensibilisatrice) peut-être excrétée par les phagocytes et se retrouver dans les plasmas du sang et des exsudats. D'après cette théorie, l'action cytotoxique ne se produit dans l'organisme que lorsque les deux ferments se rencontrent. Ceci arrive à l'état normal, dans l'intérieur des phagocytes; au contraire, à l'état de phagolyse, cette rencontre peut avoir lieu en dehors des cellules, notamment dans le plasma du liquide péritonéal. Lorsqu'on empêche la phagolyse par la préparation des phagocytes, la substance intermédiaire peut se fixer sur les éléments sensibles dans les plasmas, mais la dissolution définitive ne se produit que dans le contenu des phagocytes.

Cette théorie a été basée sur toute une série de données bien établies, parmi lesquelles il faut donner la première place au fait que les hématies et d'autres éléments figurés d'espèce étrangère sont dissous, dans le péritoine des animaux neufs, uniquement dans l'intérieur des phagocytes. Ce fait s'est trouvé en contradiction avec une assertion de M. de Dungern qui, dans son premier mémoire sur l'hémolyse[2], insista sur l'absence de toute phagocytose dans le péritoine de cobayes, auxquels il avait injecté du sang de pigeon et de poule. Mais cette affirmation étant basée sur des observations erronées, j'ai dû en relever l'inexactitude dans mon mémoire sur la résorption des cel-

1. Ces *Annales*, 1899.
2. *Münchener medic. Wochenschr.* 1899, n°s 13 et 14.

lules. Dans sa dernière publication. M. de Dungern[1] revient sur cette question. Il reconnaît à présent que l'englobement des hématies par des phagocytes se produit réellement, mais seulement dans le cas où l'on se sert « de globules rouges plus résistants, que l'on injecte en plus fortes doses ». Lorsqu'au contraire on emploie des hématies peu résistantes (sang de poule) et en petites doses, elles dégénèrent et se dissolvent dans leur plus grande partie, avant d'être englobées par les macrophages d'une façon tant soit peu notable. Je ne peux nullement partager l'opinion éclectique de M. de Dungern, et ceci parce que le fait, invoqué par lui, est contredit par l'observation. Lorsqu'on injecte dans le péritoine de cobayes neufs de très petites doses de sang défibriné de poule (par ex. 1/8 c.c.), on constate, avec facilité et précision, que les hématies sont bientôt accolées à la surface des macrophages et transportées dans leur intérieur. Il ne se produit pas la moindre dissolution des hématies nucléées dans le liquide de l'exsudat. La seule différence avec le cas où l'on injecte des quantités plus grandes de sang consiste en ceci, que la phagocytose des petites doses s'accomplit beaucoup plus vite, dans un espace de 3 à 4 heures. Je maintiens donc mon affirmation sur la phagocytose des hématies d'oiseaux dans le péritoine de cobayes neufs.

Je suis obligé de contredire encore M. de Dungern, lorsqu'il m'attribue l'assertion que, dans le tissu sous-cutané du cobaye, la dissolution des hématies d'oie se fait presque exclusivement en dehors des cellules. Je n'ai jamais dit cela, comme on peut s'en convaincre en parcourant les pages 755 et 756 de mon mémoire sur la résorption. Je ne l'ai jamais dit, par la raison que, dans le tissu sous-cutané, une partie des hématies seulement est dissoute dans le liquide, tandis que l'autre partie est digérée par les phagocytes qui se réunissent au point d'injection.

En maintenant les arguments que je faisais valoir en faveur de l'origine phagocytaire des cytotoxines, je pourrais en ajouter d'autres. D'après cette théorie, l'absence de l'hémolysine dans le sérum d'animaux, injectés avec du sang de même espèce, s'expliquerait par l'absence de phagocytose dans ces conditions et par la résorption directe des hématies dans la circulation, sans dissolution préalable. MM. Ehrlich et Morgenroth viennent

1. *Münchener medic. Wochenschr.* 1900, nº 20.

de démontrer la possibilité d'obtenir une isolysine à la suite d'injections du sang de même espèce. Seulement, pour arriver à ce résultat, au lieu d'injecter le sang intact, ils introduisaient dans le péritoine de leurs chèvres du sang de cette espèce, préalablement traité avec de l'eau. Les hématies étaient détruites dans ces conditions et subissaient une dissolution partielle. Il est évident que, dans cet état, elles ne pouvaient plus passer directement dans la circulation, mais devaient être inévitablement saisies et digérées par les phagocytes. Il y avait donc encore un exemple où la production d'hémolysine coïnciderait avec la phagocytose.

Mais ce mémoire n'est pas destiné à aborder le côté théorique de l'étude des cytotoxines. Son but est de servir plutôt d'introduction aux trois mémoires qui vont suivre, et qui touchent à l'application pratique des poisons cellulaires.

Après la découverte des cytotoxines artificielles, on devait se demander s'il n'y avait pas lieu de s'en servir pour régulariser certaines fonctions cellulaires dans les maladies ou dans la décrépitude sénile. Ainsi, j'ai exprimé cette hypothèse qu'un sérum qui gênerait les macrophages dans leur action contre les éléments nobles, pourrait être utilisé pour conserver ces derniers. C'est dans ce but que je me suis mis à préparer un sérum antiphagocytaire. Mais les faits me montrèrent bientôt l'impossibilité d'arriver au but proposé, et ceci à cause de la destruction des microphages par des sérums préparés exclusivement avec des macrophages. Il a fallu chercher ailleurs la solution du problème. C'est alors que je me suis demandé si de faibles doses des cytotoxines n'étaient point capables de produire une action stimulante sur les élémenls figurés correspondants. On savait depuis longtemps que de petites quantités de certains poisons provoquent l'excitation des organes sur lesquels les doses plus fortes agissent d'une façon paralysante. On a réuni beaucoup de faits[1] sur l'accélération des fermentations par des petites doses de poisons, comme les alcaloïdes et les antiseptiques. C'est surtout M. Schultz qui a établi ce fait que beaucoup de poisons de la levure, comme le sublimé, l'iode, l'acide arsé-

1. Ces faits sont résumés dans le 3e volume de la *Microbiologie* de M. Duclaux.

nieux, etc., appliqués en faible quantité, accélèrent notablement la fermentation alcoolique. Plus tard, M. Effront a tiré de ces données une application pratique pour augmenter le rendement de l'alcool. Il soumet la levure à l'action de doses croissantes d'acide fluorhydrique, et arrive à stimuler cette plante dans son pouvoir fermentescible. Ces exemples, auxquels on pourrait joindre un assez grand nombre d'autres, nous engagèrent à entreprendre une étude systématique sur l'action des petites doses des cytotoxines. Les préparateurs de mon service, MM. les Drs Cantacuzène et Besredka, ont bien voulu se charger d'exécuter des expériences sur l'hémotoxine et la leucotoxine. M. Besredka s'est en outre associé à moi pour faire les premiers essais sur l'homme. Les trois mémoires qui suivent donneront l'exposé des résultats obtenus jusqu'à présent.

Sur les variations quantitatives et qualitatives
DES GLOBULES ROUGES
Provoquées chez le lapin par les injections de sérum hémolytique.

Par le Dr J. CANTACUZÈNE

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Nous savons, depuis les travaux de J. Bordet, qu'il est possible, en injectant le sang d'une espèce B à une espèce A, de faire apparaître dans le sérum de cette dernière des anticorps spécifiquement hémolytiques pour les globules rouges de l'espèce B.

MM. S. Belfanti et T. Carbone, en 1878, arrivèrent de leur côté au même résultat ; ils constatèrent, d'autre part, que le sérum hémolytique fourni par A est toxique pour B, et détermine sa mort lorsqu'on lui en injecte une quantité suffisante dans les veines ou sous la peau.

Reprenant la question à un autre point de vue, nous nous proposons d'étudier ici les variations survenues dans la teneur du sang en hémoglobine et en globules rouges à la suite des injections, *in vivo*, de sérum hémolytique.

Nos expériences ont porté sur le lapin ; nous avons employé un sérum hémolytique pour les globules rouges de cet animal, et obtenu en injectant à des cobayes des doses croissantes de sang défibriné de lapin.

La technique pour la préparation de ce sérum est des plus simples. On commence par injecter dans le péritoine d'un cobaye 2 c. c. de sang de lapin recueilli aseptiquement et défibriné. La propriété hémolytique du sérum apparaît au bout de 7 jours environ, et va en augmentant les jours suivants ; 12 jours après la première injection, on injecte de nouveau 5 c. c. de sang dans le péritoine ; on fait une troisième injection de 10 c. c. 12 jours plus tard, et une dernière de 15 c. c. au bout du même laps de

temps. On obtient de la sorte un sérum très hémolytique, et dont le pouvoir hémolysant varie de 1 : 2 à 1 : 3. Le même sérum est agglutinant à 1 : 50.

Le sang d'un lapin adulte et en bonne santé contient en moyenne 6,000,000 d'hématies par mill. c. Ce nombre peut varier d'un jour à l'autre, chez le même individu, de 200,000 à 300,000 globules rouges, en plus ou en moins. En outre, le sang contient normalement un certain nombre de petits éléments arrondis, pâles, de 2-3 μ de diamètre, colorables très faiblement par l'éosine, plus faiblement encore par les couleurs basiques d'aniline, et désignés par Hayem sous le nom d'hématoblastes.

Nous leur conserverons cette dénomination sans préjuger en rien de leurs fonctions ni de leur origine. Ces hématoblastes tendent à s'agglutiner en petits amas au sein desquels disparaît leur forme primitive. Le chiffre moyen de ces éléments varie de 200,000 à 250,000 par millimètre cube. Ils sont donc environ 25 fois moins nombreux que les globules rouges adultes. Entre les hématoblastes et les hématies il existe des formes de passage ou microcytes (5 μ), qui fixent les couleurs acides d'aniline.

On ne trouve que très rarement, dans le sang du lapin normal, des globules rouges à noyau; ces éléments sont un peu plus petits qu'une hématie ordinaire; leur stroma se colore en rose vif par l'éosine; ils contiennent un petit noyau, souvent placé excentriquement, et se colorant avec intensité par les couleurs basiques. Nous avons plusieurs fois observé ces éléments en grand nombre chez des cobayes, dans les cas d'intoxications graves aboutissant à la cachexie, comme par exemple dans l'intoxication cholérique chronique. Ils semblent donc être, chez l'animal adulte, l'expression d'un état pathologique.

Le nombre des leucocytes varie en moyenne de 6,000 à 6,500 par mill. c. On y compte ordinairement 60 polynucléaires, pour 10 mononucléaires et 30 lymphocytes, grands et petits. Les polynucléaires contiennent parfois des granulations pseudo-éosinophiles, mais moins fréquemment que chez le cobaye.

Le titre moyen de l'hémoglobine est de 90 0/0, 100 étant pris pour valeur moyenne du sang humain.

Les variations journalières de l'hémoglobine sont faibles, de quatre à cinq centièmes en dessus ou en dessous, sans régularité appréciable.

MODIFICATIONS OBSERVÉES DANS LE SANG A LA SUITE DES INJECTIONS DE SÉRUM

a) *Injections de sérum normal.* — Le sérum de cobaye normal n'est pas, *in vitro*, hémolytique pour le sang de lapin. Dans la proportion de 15 : 1, il détermine une légère agglutination. Cependant son injection au lapin n'est pas absolument indifférente.

Si, en effet, l'on injecte 5 c. c. de sérum de cobaye normal dans la veine auriculaire d'un lapin, il y a dès le lendemain une baisse sensible dans le nombre des hématies, qui tombent par exemple de 5,800,000 à 4,700,000. Puis leur nombre augmente régulièrement pour revenir à la normale au bout de 4-5 jours. Dès le début du processus on constate l'apparition, dans le sang, d'un nombre d'hématoblastes très supérieur à la normale (5000.00 au lieu de 250,000 ; cette poussée hématoblastique s'éteint au bout de 2-3 jours. Le titre hémoglobine descend, en même temps que le chiffre des hématies s'abaisse : il tombe de 91 à 75, et reste à ce niveau inférieur pendant quelques jours, malgré la hausse globulaire. C'est seulement vers le sixième jour de cette courte maladie qu'il revient à son niveau primitif.

Il y a une légère augmentation du nombre des leucocytes, portant surtout sur les polynucléaires. Les granulations éosinophiles n'augmentent pas. A aucun moment, la santé de l'animal ne semble troublée.

b) *Injections de sérum hémolytique : doses fortes.* — Nous appelons *doses fortes* celles dont l'injection sous-cutanée provoque, à coup sûr, un abaissement simultané dans le chiffre des hématies et dans le titre de l'hémoglobine. Elles sont comprises, pour notre sérum hémolytique, entre ∞ et 1 c. c., la limite inférieure de 1 c. c. étant forcément un peu arbitraire.

Si l'on injecte dans la veine de l'oreille d'un lapin une dose très forte de sérum hémolytique, 15 c. c. par exemple, l'animal, au bout de quelques secondes, tombe, présente des mouvements cloniques violents, des phénomènes de dyspnée et de cyanose aiguës, pousse quelques cris et meurt au bout de 1-2 minutes. Le fait avait déjà été signalé par Belfanti et Carbone.

Si l'on injecte dans la veine une dose non mortelle de sérum hémolytique, 2-3 c. c. par exemple, on observe les phénomènes

suivants : il se produit une diminution presque immédiate du nombre des hématies ; au bout de 1 heure ce nombre a baissé déjà de 1,500,000. Si à ce moment on examine le sang au microscope, on constate que de très nombreux globules rouges sont entourés d'une auréole diffuse se colorant en rose par l'éosine, tandis que le globule placé au centre ne prend plus que faiblement la couleur. Le stroma de l'hématie laisse de la sorte échapper son contenu sous forme de grosses gouttelettes qui apparaissent sur le bord du disque globulaire, puis diffusent dans le milieu ambiant. L'hématie finit par persister sous la forme d'une vésicule vide, incolore, à peine perceptible. Bon nombre d'hématies semblent rester normales.

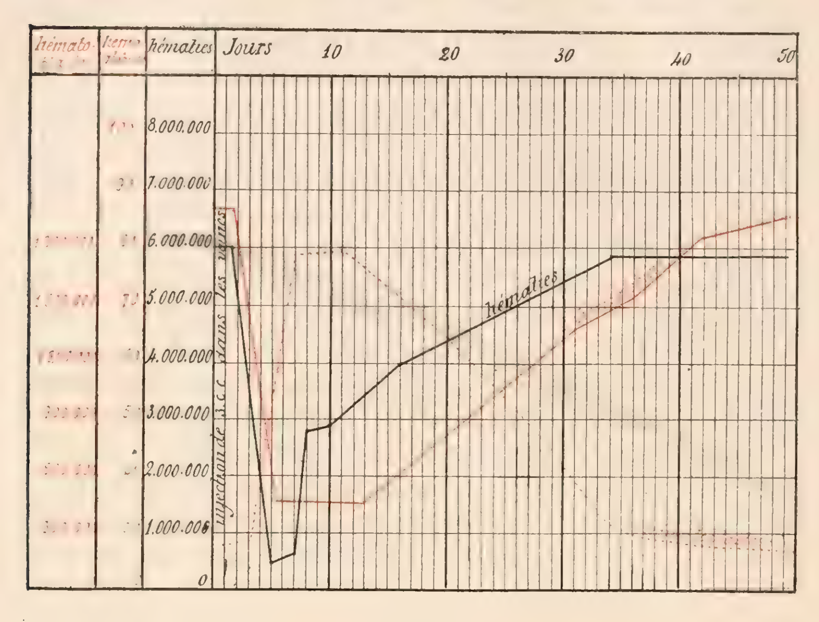
Cette dissolution des hématies dans le sang continue les jours suivants; au bout de 36 heures leur nombre a passé de 6,000,000 à 600,000 pour tomber à 300,000 au bout de 48 heures. Les 19/20 des globules sont, de la sorte, détruits. A ce moment on trouve encore quelques hématies entourées d'une faible auréole de diffusion. La plupart des éléments restants se colorent avec intensité et présentent l'aspect normal.

A mesure que les phénomènes d'anémie s'accentuent, le nombre des hématies nucléées augmente ; elles atteignent leur maximum lorsque le chiffre des globules rouges est au plus bas.

Vers le quatrième jour, le sang est envahi brusquement par un nombre colossal d'hématoblastes. Leur chiffre, primitivement de 250,000, monte rapidement à 1,700,000 ; en même temps apparaissent une foule de formes de passage entre les hématoblastes et les globules adultes. Le sang présente à ce moment un aspect réellement curieux, à cause de la diversité des hématies, tant au point de vue de la taille qu'au point de vue de l'affinité pour l'éosine. Cette affinité ne se rapproche de celle des globules adultes qu'à partir du moment où les disques atteignent un diamètre de 5-6 μ. Au moment où se fait la poussée hématoblastique, le nombre des globules nucléés commence à baisser rapidement.

C'est également à partir de ce moment que les hématies adultes augmentent en nombre. Leur chiffre est déjà de 2,500,000 une semaine après l'injection ; d'autre part, la poussée des hématoblastes se modère progressivement ; quant aux

globules nucléés, ils ont totalement disparu. Au bout de six semaines environ, le processus de réparation est terminé; le sang a repris sensiblement ses caractères normaux. Cependant le nombre des globules rouges tend plutôt à s'arrêter en deçà du chiffre normal, et, dans tous les cas, ne le dépasse pas.



Tracé n° 1.

En même temps que s'opère la déglobulisation, il se produit une chute brusque dans le titre de l'hémoglobine, qui en 4 jours passe de 85 0/0 à 35 0/0. L'hémoglobine se maintient à ce niveau inférieur pendant un temps assez long et ne suit pas immédiatement le mouvement d'ascension des globules rouges. Ce n'est qu'à partir du moment où ces derniers atteignent 2.000.000 au moins par mill. c. que l'hémoglobine augmente progressivement. On peut en conclure que les hématoblastes ne contiennent pas d'hémoglobine. — Au bout de 7 semaines environ, l'hémoglobine est revenue au taux normal.

Dès le début de ces processus d'anémie, il y a leucocytose marquée dans le sang; le chiffre des leucocytes s'élève de 6,300 à 9,000 par millimètre cube: en outre la proportion des polynucléaires augmente considérablement; elle atteint son

maximum vers le moment où les hématies sont à leur minimum : ces éléments représentent à ce moment 80 0/0 (au lieu de 55 0/0) du nombre total des leucocytes. Ils se maintiennent à ce taux élevé pendant une quinzaine de jours environ, puis diminuent lentement.

Jamais, au cours de ces anémies expérimentales aiguës, nous n'avons vu augmenter le nombre des pseudo-éosinophiles



Tracé n° 2.

dans le sang. Les polynucléaires contiennent, même à ce moment, remarquablement peu de ces granulations (Tracé 1.)

Si l'injection est faite, non pas dans les veines, mais sous la peau, on observe la même série de phénomènes, mais avec une intensité moindre. Toujours on constate que l'augmentation du nombre des globules nucléés accompagne la baisse du chiffre des hématies ; puis ils disparaissent quand se fait la poussée hématoblastique.

Si au moment où la richesse globulaire du sang tend à se rapprocher de la normale, on injecte à l'animal une faible dose de sérum hémolytique sous la peau (1/25 c. c. par exemple), on voit se produire une brusque augmentation du chiffre des hématies ; sitôt que ce chiffre se met à dépasser le taux normal, presque tous les leucocytes polynucléaires se chargent de grosses

granulations pseudo-éosinophiles. C'est là un fait constamment observé, et qui, nous le verrons plus loin, a une importance réelle au point de vue pronostic.

c) *Injections de sérum hémolytique : doses faibles.* — Nous appelons *doses faibles* celles dont l'injection sous-cutanée provoque une *élévation* simultanée dans le chiffre des hématies et dans le titre de l'hémoglobine. Elles sont comprises pour notre sérum hémolytique entre 1/10 c. c. et 1/30 c. c. Au-dessous de cette fraction, l'effet de l'injection sur les variations sanguines n'est plus appréciable.

Entre le groupe des doses fortes et celui des doses faibles, il existe une zone moyenne de doses comprises entre 1 c. c. et 1/10 de c. c., ou *doses demi-faibles*. Les effets de ces dernières sont intéressants à étudier; leur injection sous la peau est marquée en effet, au début, par une dissociation entre les variations de l'hémoglobine d'une part et des hématies de l'autre.

Injectons en effet sous la peau d'un lapin 1/8 c. c. de sérum hémolytique. La richesse globulaire varie peu pendant 48 heures. Puis vers le 3e jour il y a une élévation notable du chiffre des globules rouges, élévation qui atteint son maximum vers le 5e jour; le taux globulaire reste élevé pendant une dizaine de jours environ, puis redescend progressivement à la normale. La poussée hématoblastique se fait dès le lendemain de l'injection; à aucun moment on n'observe de globules nucléés.

Le titre de l'hémoglobine baisse au contraire fortement 24 heures après l'injection, pour atteindre un minimum vers le 5e jour; c'est vers le 11e jour seulement qu'il s'élève pour dépasser bientôt la normale et se maintenir pendant plusieurs jours à un taux relativement élevé. L'augmentation de l'hémoglobine coïncide, de la sorte, avec la fin de la poussée hématoblastique. (Tracé 2.)

Dès le lendemain de l'injection, presque tous les polynucléaires se chargent de granulations pseudo-éosinophiles.

L'injection des doses faibles, lorsque l'animal est bien portant, s'accompagne constamment d'une augmentation simultanée de la richesse globulaire et du titre hémoglobique.

Par contre, lorsque l'animal est atteint de grippe épidémique des lapins, cette maladie toujours mortelle et si fréquente dans les laboratoires, les injections sont fréquemment suivies d'un

abaissement dans les quantités de globules rouges et d'hémoglobine.

Étudions donc les modifications du sang qui accompagnent l'injection à un lapin sain d'une faible dose (1/25 c. c. par exemple) de sérum hémolytique.

Dès le lendemain, on constate une augmentation notable du nombre des hématies ; au bout de 3 jours leur chiffre a passé par exemple de 5,400,000 à 8,800,000. Pendant une semaine le chiffre oscille entre 8 et 9 millions, et redescend à la normale progressivement en 3 semaines. A aucun moment, on ne constate dans le sang la présence de globules nucléés. Par contre, dès le début du processus, le nombre des hématoblastes augmente considérablement.

Quant à l'hémoglobine, ses variations suivent celles des hématies ; elle passe en 3 jours de 86 par exemple à 105. Elle se maintient quelques jours à ce taux élevé, puis elle diminue tout en restant pendant 2 à 3 semaines au-dessus de la normale.

D'une façon absolument constante, au moment où se fait la poussée hématoblastique, les polynucléaires se chargent de granulations pseudo-éosinophiles. Le fait est tellement constant qu'il peut servir d'élément de pronostic, l'apparition en grand nombre des granulations pseudo-éosinophiles présageant un accroissement du taux globulaire. Elle manque lorsque ce taux s'abaisse.

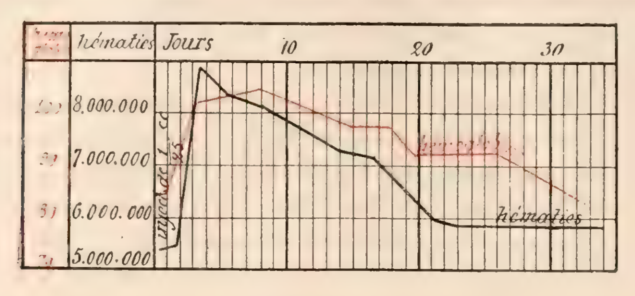
Constamment aussi, l'on observe l'augmentation notable des polynucléaires, qui passent de 58 0/0 à 77 0/0 et cela d'une façon assez durable.

Bref l'injection de faibles doses de sérum s'accompagne d'une élévation rapide des taux globulaire et hémoglobique. Cette élévation persiste de 2 à 3 semaines (Tracés 3 et 4).

d) *Injections réitérées de sérum hémolytique à faibles doses.* — Comment varient la richesse globulaire et le titre de l'hémoglobine lorsque l'on réitère les injections en augmentant progressivement les doses de sérum, en un mot lorsque l'on vaccine l'animal contre le sérum hémolytique ?

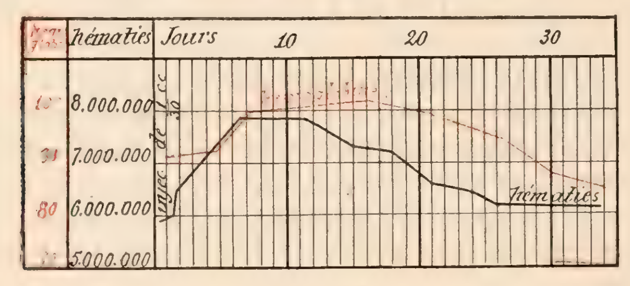
Les intervalles qui séparent deux injections successives doivent être déterminés par l'état de la poussée hématoblastique. Si en effet la 2e injection est faite alors que les hémato-

blastes sont encore très nombreux dans le sang, cette injection est fréquemment suivie d'un abaissement dans le nombre des



Tracé n° 3.

hématies et dans le titre de l'hémoglobine; si au contraire on n'injecte une dose nouvelle que lorsque les hématoblastes ont repris leur état d'équilibre, on assiste à une nouvelle augmen-



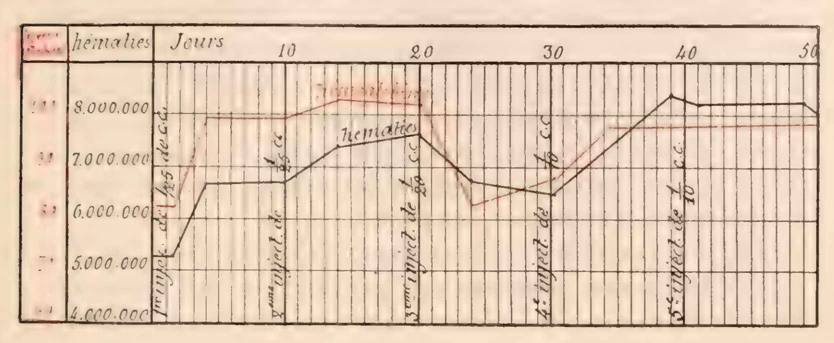
Tracé n° 4.

tation des globules et de l'hémoglobine; cette augmentation est d'ailleurs moins considérable que la première; souvent même elle ne se produit pas après la 2e injection; il faut renouveler les injections 3 et 4 fois pour la voir apparaître. Chaque accroissement de la richesse sanguine s'accompagne d'une nouvelle poussée d'hématoblastes.

On arrive de la sorte à produire chez l'animal un certain degré d'accoutumance. Au bout d'un petit nombre d'injections suffisamment espacées, on atteint, tant au point de vue de la richesse globulaire qu'au point de vue du titre de l'hémoglobine, un nouveau maximum que l'on ne réussit pas à dépasser, mais auquel on parvient à maintenir le sang pendant quelque temps (6 semaines, dans deux de nos observations). Après quoi les

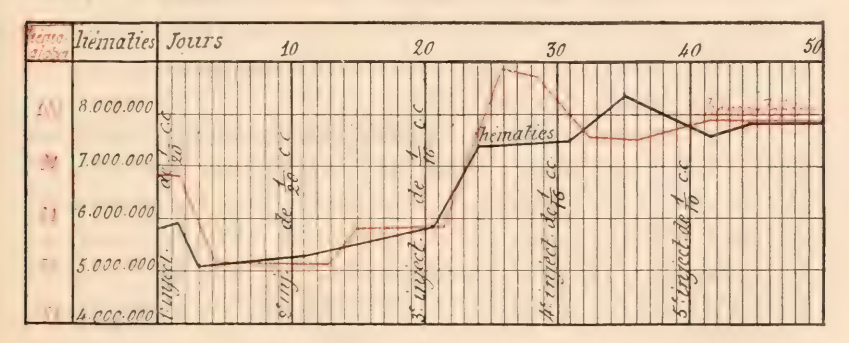
titres globulaire et hémoglobique redescendent progressivement à la normale (Tracés 5 et 6).

Il existe des individus qui ne réagissent pas, dès la 1re injection, dans le sens d'une augmentation globulaire, on trouve



Tracé n° 5.

même des cas (tracé n° 6) où cette 1re injection, quoique faible, est suivie d'une diminution des globules et de l'hémoglobine ; cette baisse s'accompagne de l'apparition des globules nucléés. Ce n'est alors qu'après la 2e ou 3e injection que se fait la poussée



Tracé n° 6.

hématoblastique, coïncidant, comme toujours, avec la disparition des globules à noyau et l'apparition des granulations pseudo-éosinophiles.

Tels sont les premiers résultats de nos recherches sur l'action, *in vivo*, des sérums hémolytiques. Il importe surtout d'en retenir ceci : c'est que le sérum, hémolytique *in vitro* et *in vivo* pour le sang de lapin, constitue au contraire un stimulant spécifique de

la fonction hématopoiétique lorsqu'il est employé à doses suffisamment faibles.

Plus nous avançons dans l'étude des actions toxiques, plus nous apercevons que la toxicité est une notion toute relative, et que bien des substances qui semblent au premier abord incompatibles avec la vie des cellules, représentent au contraire, à faibles doses, des stimulants biologiques de premier ordre. — L'action excitante du sérum hémolytique n'est qu'un cas particulier de cette loi qui semble appelée à devenir générale.

Voici maintenant, en résumé, les notions qui se dégagent des expériences exposées plus haut :

1° Au-dessus d'une certaine dose, l'injection de sérum hémolytique détermine, *lorsqu'elle n'est pas mortelle*, une déglobulisation aiguë suivie d'une réparation lente du sang, sans que, finalement, la richesse globulaire ou le titre hémoglobique dépasse leur état normal d'équilibre ;

2° Si l'on étudie l'action de doses de plus en plus faibles, on constate qu'il existe, pour chaque individu, une dose minima au-dessous de laquelle l'hémolysine injectée devient stimulante de l'hématopoièse. Dans ce cas, en effet, l'injection de sérum s'accompagne d'une élévation de la richesse globulaire et du titre hémoglobique du sang. Cette élévation persiste quelques jours pour revenir à la normale ;

3° Les injections faibles, répétées et suffisamment espacées, portent à son maximum l'action stimulante du sérum, sans qu'il semble, néanmoins, possible de dépasser une certaine limite marquée, chez le lapin, par le chiffre de 9,000,000 pour les hématies, de 110 pour l'hémoglobine. Le sang se maintient quelques semaines à ce niveau supérieur, puis reprend progressivement à son état d'équilibre primitif. L'élévation du titre hémoglobique persiste sensiblement plus longtemps que l'augmentation de la richesse globulaire ;

4° L'augmentation des globules a débuté dans tous les cas observés par une brusque poussée hématoblastique, qui s'éteint à mesure que la nouvelle formation globulaire tend vers son maximum. L'apparition dans le sang d'hématies nucléées coïncide avec les périodes de déglobulisation, et cesse sitôt que se fait la poussée d'hématoblastes ;

5° Toute élévation du taux globulaire au-dessus de la nor-

male s'accompagne de l'apparition, dans le protoplasma des leucocytes polynucléaires, de granulations pseudo-éosinophiles, ce qui fournit un bon élément de pronostic relativement à l'énergie de l'hématopoièse;

6° Les injections de sérum hémolytique déterminent dans le sang une leucocytose et, particulièrement, une polynucléose assez persistante. Le fait s'explique en partie si l'on songe que le sérum hémolytique doit être aussi leucolytique dans une faible mesure.

LA LEUCOTOXINE ET SON ACTION

SUR LE SYSTÈME LEUCOCYTAIRE

Par le Dr BESREDKA

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

La conception phagocytaire de M. Metchnikoff sur le mécanisme des phénomènes atrophiques[1] l'a conduit naturellement à rechercher les moyens de paralyser l'activité intempestive des leucocytes, lorsque ceux-ci viennent s'attaquer à des éléments nobles de l'organisme et compromettent ainsi les fonctions essentielles de la vie.

De là est né le sérum antileucocytaire, ou mieux le *sérum leucotoxique*, qui était primitivement destiné, dans l'esprit de son auteur, M. Metchnikoff, à agir exclusivement sur les macrophages, agents si redoutables au cours des processus atrophiques.

Mais lorsque les premières expériences tentées dans cette voie eurent démontré que les sérums leucotoxiques, quel que fût leur mode de préparation, détruisent indifféremment toutes les espèces de leucocytes, mononucléaires aussi bien que polynucléaires, M. Metchnikoff eut l'heureuse idée de tourner la difficulté en se disant que, dans une lutte inégale, on peut intervenir utilement non seulement en affaiblissant celui qui attaque, mais encore en renforçant celui qui est attaqué.

Or, les sérums cyto-toxiques, qui détruisent à haute dose leurs éléments respectifs, devaient *a priori*, par analogie avec ce que l'on sait au sujet de certains poisons et antiseptiques, se montrer stimulants pour ces mêmes éléments, étant employés à faible dose.

Si cette hypothèse venait réellement à se justifier pour les sérums cellulo-toxiques en général, ne serait-ce pas le meilleur moyen de tourner la difficulté dont il vient d'être question, sans

1. *Année biologique*, 1897.

parler du précieux avantage de pouvoir commander en quelque sorte des catégories entières de cellules qui échappaient jusqu'ici presque entièrement à l'influence extérieure.

Il ne restait donc qu'à rechercher expérimentalement jusqu'à quel point l'analogie indiquée est vraie, en d'autres termes, si véritablement les sérums destructeurs de cellules sont capables, injectés à faible dose, de provoquer un effet tout opposé à celui qu'ils produisent à haute dose.

Le présent travail ne constitue qu'une page de ce nouveau chapitre de microbiologie dû à M. Metchnikoff; il a pour but de montrer que l'effet stimulant de petites doses n'est pas une vue de l'esprit, mais repose sur des faits faciles à mettre en évidence, notamment en ce qui concerne le sérum leucotoxique.

Les sérums leucotoxiques sont spécifiques dans la majorité des cas : un sérum qui détruit les leucocytes d'un animal n'est généralement pas actif vis-à-vis des leucocytes d'un animal d'une autre espèce.

Dans l'espoir d'obtenir un sérum contre les globules blancs de l'homme, nous avons essayé toute une série de sérums préparés avec les ganglions lymphatiques provenant d'un certain nombre d'animaux (cheval, bœuf, veau, mouton, chèvre, chien); aucun de ces sérums ne se montra actif à l'égard des leucocytes humains.

Cette spécificité n'est pas cependant absolue; ainsi, dans une de nos expériences, un sérum leucotoxique pour le bœuf, fourni par un cobaye, l'a été aussi pour le lapin; de même, un sérum de chèvre, leucolytique pour l'homme, se montra fortement leucotoxique pour les globules blancs de cobayes[1]; mais ce sont là plutôt des exceptions qui n'infirment pas le principe de spécificité couramment observé.

Comme nous nous proposons d'opérer seulement sur des lapins et des cobayes, c'est aux ganglions mésentériques de ces deux rongeurs que nous nous sommes adressé pour la préparation de leurs leucotoxines respectives.

Pour avoir une bonne leucotoxine, active pour le lapin, il suffit d'injecter sous la peau du cobaye une émulsion d'une

1. Ce sérum se montra également très actif vis-à-vis des leucocytes de lapin, mais cette propriété existait déjà avant l'immunisation à un très fort degré.

moitié de pancréas Aselli de lapin, et cela à deux reprises, à huit jours d'intervalle. Quinze jours après la première injection, on obtient dans ces conditions un sérum qui dissout les globules blancs de lapin en proportion de 1/20 en moyenne (une partie de sérum pour 20 parties de lymphe péritonéale).

La leucotoxine est moins forte lorsqu'on s'adresse au lapin comme fournisseur de sérum, et qu'on lui injecte des ganglions mésentériques de cobayes. En raison des petites dimensions de ces ganglions, nous nous vîmes forcé d'injecter à des lapins à la fois deux ou même trois ganglions entiers de cobayes, et de répéter ces injections au moins trois fois, avec huit jours d'intervalle entre deux injections.

Mais même en opérant ainsi, on obtient rarement un sérum qui détruise les leucocytes de cobayes dans les mêmes proportions et avec la même rapidité que cela s'observe pour les globules de lapins par leur leucotoxine spécifique.

Quelquefois, nous préparions la leucotoxine en nous servant de la moelle osseuse de lapins. Le sérum ainsi obtenu est très actif, mais il a l'inconvénient d'être en même temps très hémolytique; nous devons d'ailleurs remarquer que, même préparés avec les ganglions mésentériques, les sérums sont toujours légèrement hémolytiques, bien que l'émulsion originaire ne contienne macroscopiquement aucune trace de sang.

Les sérums leucotoxiques sont très peu stables; ils perdent *in vitro* leurs propriétés spécifiques encore plus facilement que les sérums hémolytiques. Le chauffage à 55° pendant une demi-heure leur fait perdre entièrement leur propriété dissolvante. Les ganglions mésentériques chauffés au-dessus de 60° ou traités par l'alcool absolu ne donnent pas lieu, en injections sous-cutanées, à la production des propriétés leucolytiques.

Les fonctions importantes qui sont dévolues dans l'économie aux globules blancs font que les sérums antileucocytaires constituent de véritables toxines pour l'animal sensible, cela va de soi. L'injection du sérum leucotoxique à un animal peut non seulement le rendre malade pendant un certain temps, mais est capable de le tuer plus ou moins rapidement, selon la force du sérum, sa quantité et le point d'inoculation — tout comme pour les autres toxines connues.

Cette ressemblance avec les toxines nous a engagé à immu-

niser les animaux — lapins et cobayes — contre leurs leucotoxines spécifiques : les résultats positifs de ces expériences, sur lesquels nous reviendrons tout à l'heure, fournissent une preuve de plus en faveur de l'analogie des leucotoxines avec les toxines d'origine microbienne.

Rien n'est plus facile que de déterminer la dose d'un sérum antileucocytaire mortelle en un temps donné.

Ce dosage doit être de préférence pratiqué avec des cobayes, et voici pourquoi : lorsqu'on injecte de la leucotoxine à un lapin, sous la peau ou dans la veine, il y a toujours, la dose fût-elle assez forte, une période d'incubation assez longue, qui dure parfois 6-8 jours, et pendant laquelle rien, dans l'aspect extérieur du lapin, ne prédit quel va être le résultat de l'inoculation — mort ou guérison.

Il en va tout autrement chez les cobayes ; une injection intrapéritonéale fournit la réponse déjà dans les 24 heures, ou quelquefois au bout de quelques heures, si la dose est forte et le sérum fraîchement recueilli. Ceci a de l'importance, car en raison de la fragilité très grande de tous ces sérums, il est indispensable, avant chaque expérience, d'être renseigné aussi rapidement que possible sur ce que vaut un sérum au point de vue de sa toxicité.

Cette toxicité est très variable suivant les cas ; ainsi, nous avons souvent opéré avec un sérum qui tuait un cobaye de 300-350 grammes, en injection intrapéritonéale, à la dose de 0,5 c. c. Avec 3 c. c. du même sérum, un cobaye du même poids mourait déjà après 3-4 heures. Dans ce dernier cas, aussitôt après l'injection, le cobaye se couche sur le ventre, son poil se hérisse, les selles sont souvent diarrhéiques, le ventre est ballonné et douloureux, l'animal se refroidit, la température rectale tombe au-dessous de 30°. A l'autopsie on constate une congestion intense de tous les viscères ; la cavité péritonéale renferme un exsudat très abondant, limpide, très pauvre en éléments figurés et surtout en leucocytes ; c'est à peine si l'on trouve dans un champ de microscope deux ou trois globules blancs, plus ou moins dégénérés, à côté d'un assez grand nombre de cellules endothéliales. Si la mort est rapide, le liquide péritonéal et le sang sont stériles.

Lorsque la dose de la leucotoxine n'est pas rapidement mor-

telle, et que le cobaye meurt seulement au bout de un ou plusieurs jours, alors on observe souvent un phénomène curieux qui consiste en ceci ; la cavité péritonéale, dans laquelle fut injecté le sérum leucotoxique, est envahie par des microbes et devient en même temps le siége d'un afflux leucocytaire intense ; quelquefois les leucocytes ont raison des microbes, et l'animal survit ; plus souvent ce sont les microbes qui prennent le dessus, le liquide péritonéal devient louche, de consistance sirupeuse, en raison de l'immense quantité de microbes qu'il renferme ; ceux-ci passent ensuite dans le sang, et le cobaye ne tarde pas à mourir d'infection généralisée. Comme on avait soin avant chaque expérience de s'assurer de la pureté du sérum employé, il faut admettre que les microbes en question arrivaient de l'intestin dans le péritoine, ce passage à travers la paroi intestinale étant favorisé par l'état d'infériorité des leucocytes, qui ne peuvent plus exercer leur vigilance habituelle.

Il nous reste à voir ce qui se passe dans la cavité péritonéale de cobayes lorsqu'on vient à leur injecter une dose de leucotoxine forte, mais non mortelle.

Aussitôt après l'injection, le cobaye devient sensiblement malade ; tantôt il se couche, tantôt il reste immobile dans un coin de sa cage, en faisant de son corps des mouvements comme si le liquide injecté était très irritant. Malgré des symptômes inquiétants qui font d'abord prévoir une issue mortelle, le cobaye est déjà rétabli, quelques heures après l'injection, à tel point que rien dans son aspect extérieur ne révèle plus les changements morphologiques si intéressants que subit dans sa composition le liquide péritonéal.

Ces phénomènes péritonéaux, consécutifs à l'inoculation de faibles doses de leucotoxine, sont d'une portée théorique telle que nous n'hésitons pas à entrer à ce sujet dans quelques détails.

Prenons deux cobayes de même poids, injectons à un d'eux, dans la cavité péritonéale, une dose forte, mais non mortelle, de sérum leucotoxique (provenant du lapin) ; à l'autre, la même quantité de sérum, mais provenant d'un lapin neuf.

Dans le premier temps qui suit l'tnjection, dans l'un des cas comme dans l'autre, les phénomènes observés dans le péritoine se réduisent à ceci ; le liquide péritonéal est limpide, très

pauvre en globules blancs et assez riche en cellules endothéliales desquamées ; au fur et à mesure que l'on s'éloigne du moment de l'injection : les cellules endothéliales deviennent plus rares, par contre, les leucocytes commencent à affluer en assez grand nombre.

Le lendemain de l'injection, celui des deux cobayes qui a reçu du sérum normal, présente un exsudat très riche en leucocytes, surtout en polynucléaires, et notablement plus riche qu'à l'état normal ; quant à l'autre cobaye, si la dose de la leucotoxine était forte, son liquide péritonéal est encore loin d'atteindre le lendemain le taux globulaire présenté par le témoin : il est même au-dessous de la richesse moyenne d'un cobaye normal. Cet état de choses peut durer deux jours ; ce n'est qu'après cette période que la différence entre les deux cobayes devient tout à fait caractéristique.

Tandis que chez le cobaye injecté avec du sérum neuf le liquide péritonéal est revenu à l'état normal, le cobaye injecté de leucotoxine présente un exsudat dont la richesse leucocytaire devient de plus en plus prononcée.

De limpide qu'il est généralement, l'exsudat chez ce dernier cobaye devient louche, épais, visqueux, difficile à retirer au moyen d'un tube effilé ; sur les préparations colorées on voit des masses compactes de leucocytes — mononucléaires en grande partie — entassés les uns sur les autres. Et, fait remarquable, cette hyperleucocytose dans la cavité péritonéale n'est pas passagère, elle se maintient pendant plusieurs jours de suite, ce qui la distingue essentiellement de l'hyperleucocytose déterminée par les substances généralement employées à cet effet (bouillon, sérum, eau physiologique), qui ne se maintient pas au delà de 24 ou 48 heures. Au sixième jour encore, après l'injection de la leucotoxine, on constate souvent dans l'exsudat péritonéal un nombre inusité de leucocytes, tandis que chez le témoin tout est rentré depuis longtemps dans l'ordre.

On possède donc dans le sérum leucotoxique un moyen d'obtenir dans la cavité péritonéale un afflux leucocytaire qui est à la fois plus intense et plus durable que celui provoqué avec n'importe quelle autre substance connue jusqu'à présent.

Nous venons de dire que les deux premiers jours qui suivent l'injection de la leucotoxine, on observe généralement non une

augmentation, mais une diminution du nombre de globules comparativement à l'état normal.

Or cette hypoleucocytose initiale, qui plus tard fait place à une hyperleucocytose, n'a lieu qu'après la première injection de leucotoxine; lors de la seconde injection de la même dose de leucotoxine, on constate déjà dès le lendemain une hyperleucocytose des plus fortes, beaucoup plus forte que celle obtenue dans les mêmes conditions avec le sérum normal.

Le stade hyperleucocytaire. une fois établi, présente les mêmes caractères que nous venons de décrire il y a un instant à la suite de la première injection, c'est-à-dire qu'il se caractérise à la fois par son intensité et par sa longue durée.

Afin de juger du degré de l'hyperleucocytose produite par la leucotoxine, nous avons essayé à plusieurs reprises de faire une numération comparative des globules chez des cobayes injectés de sérum neuf, et injectés de sérum leucotoxique. L'opération n'est pas sans présenter certaines difficultés pour ce dernier cas, étant donnée surtout la consistance sirupeuse de l'exsudat, qui se refuse à monter dans le tube capillaire. Nous avons cependant réussi à pratiquer la numération dans plusieurs cas.

Voici quelques chiffres qui peuvent donner une idée approximative de la richesse globulaire observée dans le péritoine des deux sortes de cobayes.

Dans un cas, quatre jours après une deuxième injection de sérum normal (0,5 c. c.), nous avons trouvé 17,500 leucocytes par m. m. c., presque tous mononucléaires; chez le cobaye ayant reçu la même quantité (0,5 c. c.) de sérum leucotoxique, également la deuxième fois, le nombre de leucocytes était de 166, 500 par m. m. c.

Après une troisième injection, les leucocytes ne cessent pas de se montrer sensibles à la leucotoxine et d'affluer en grand nombre dans le péritoine : témoins deux cobayes d'une autre série, qui ont été inoculés pour la troisième fois : un — de sérum normal, l'autre — de sérum leucotoxique; quatre jours après cette troisième injection, le témoin (sérum normal) avait 52,000 gl. par m. m. c., l'autre (sérum leucotoxique) en avait 462,000 par m. m. c.

Ces deux exemples peuvent suffire pour donner une notion

du degré d'excitabilité de l'appareil leucocytaire sous l'influence des doses non mortelles de leucotoxine.

L'expérience montre que l'on peut multiplier les injections péritonéales de leucotoxine chez le même cobaye sans faire disparaître la réaction si caractéristique des leucocytes; ainsi, même après la sixième injection de leucotoxine, il nous a été donné de constater une hyperleucocytose très manifeste avec ses caractères ordinaires, bien que la dose de leucotoxine injecté n'ait pas sensiblement varié d'une injection à l'autre.

Ceci est d'autant plus intéressant à noter que, déjà après deux ou trois injections de sérum leucotoxique, le sérum de cobaye acquiert des propriétés antitoxiques.

Lorsque trois semaines environ à partir de la première injection, on prélève chez le cobaye un peu de sang, on constate que celui-ci est franchement *antileucotoxique :* additionné de sérum leucotoxique en certaines proportions, il empêche la dissolution des globules blancs, tandis que la même quantité de sérum de cobaye normal n'empêche aucunement l'action dissolvante de la leucotoxine.

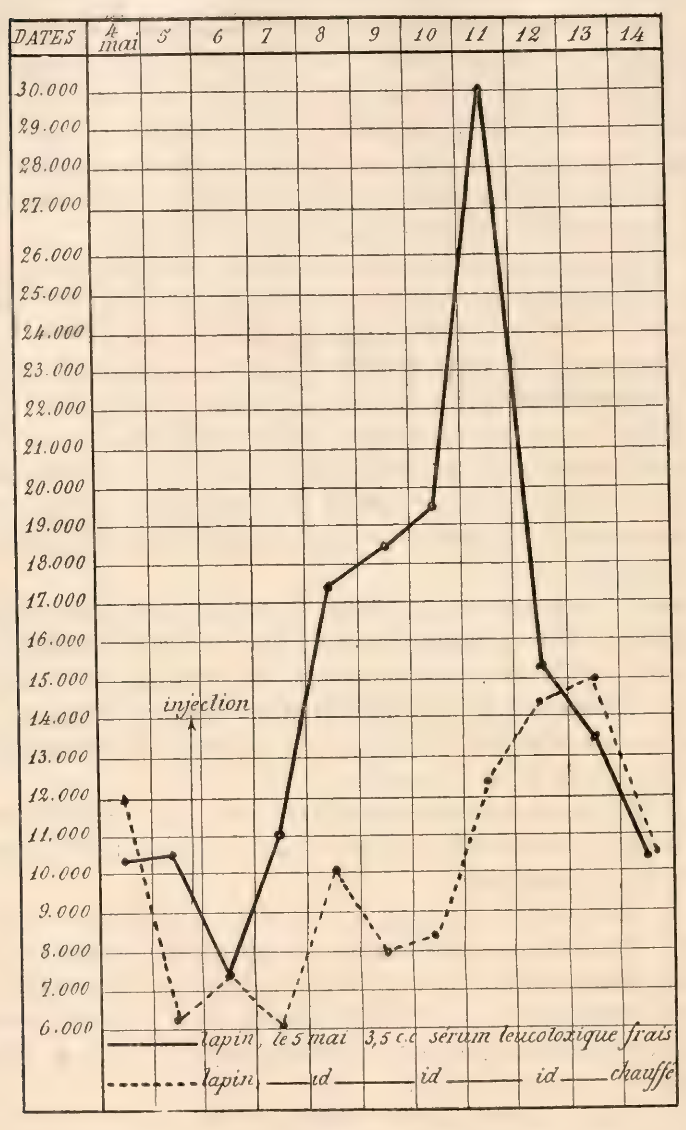
Nous laissons pour le moment de côté la question de l'antileucotoxine et de ses propriétés que nous nous réservons d'étudier plus tard. Ici nous voulons seulement souligner ce fait que, malgré la presence de l'antileucotoxine dans le sérum de cobayes, ceux-ci n'en cessent pas moins de réagir vis-à-vis de nouvelles injections de leucotoxine.

Jusqu'ici nous nous sommes servis de la cavité péritonéale de cobayes pour constater l'afflux leucocytaire qui suit l'injection de la leucotoxine.

Afin de s'assurer qu'il s'agit ici d'un phénomène d'ordre général, et aussi pour en donner une expression la plus mathématique possible, nous nous sommes adressé au lapin. Le riche réseau veineux qui couvre l'oreille des lapins se prête facilement à la numération de globules, même lorsque celle-ci doit être répétée 8 à 10 fois de suite.

Si la leucotoxine possède réellement le pouvoir d'exciter l'appareil leucocytaire, on devrait, avons-nous pensé, pouvoir produire une hyperleucocytose dans le système circulatoire par une injection sous-cutanée de leucotoxine, ce que les expériences ont en effet confirmé.

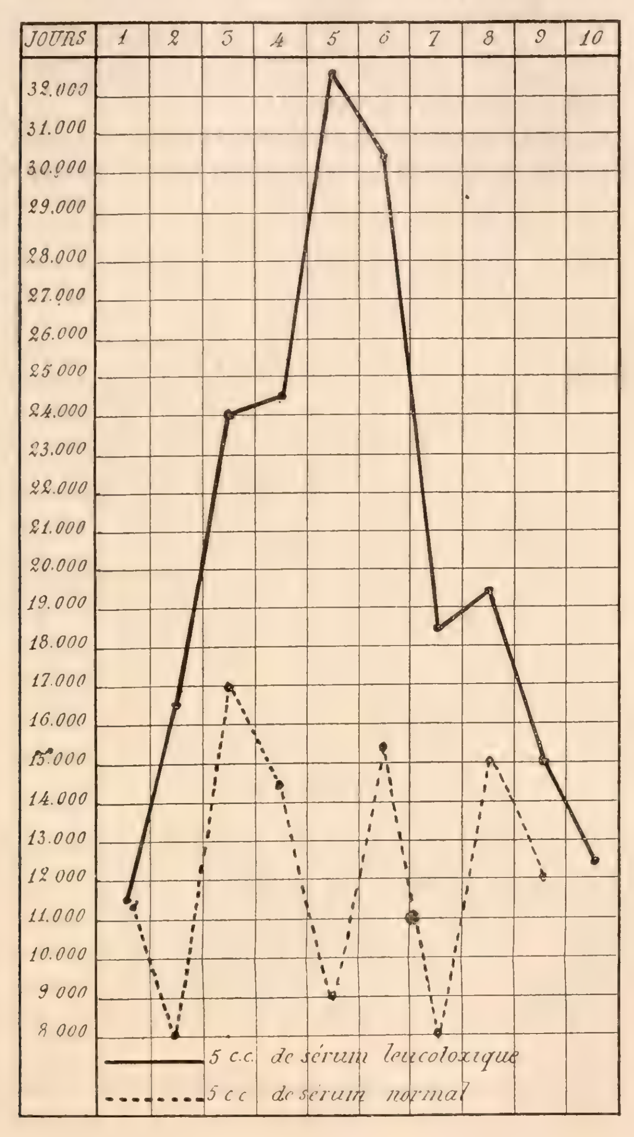
Lorsqu'on injecte *sous la peau* de lapin une dose forte, mais



Courbe n° 1.

non mortelle, de sérum leucotoxique — actif pour le lapin et fourni par le cobaye, — on constate dans le sang circulant, pendant plusieurs jours de suite, une augmentation considérable de

leucocytes, phénomène qui ne s'observe jamais au même degré



Courbe n° 2.

avec le sérum normal de cobaye. L'effet excitant de la leucotoxine devient surtout très manifeste lorsque, d'une part, on injecte à un lapin du sérum leucotoxique frais, et d'autre part, à un lapin

témoin, du même sérum, mais chauffé à 55° et par conséquent, privé de ses propriétés leucotoxiques.

Voici des courbes représentant les variations leucocytaires observées chez les lapins après injection de sérum leucotoxique frais et chauffé, et de sérum normal[1].

Il ressort de l'examen de ces courbes que les phénomènes que l'on constate chez le lapin après injection sous-cutanée sont



Courbe n° 3.

en tout comparables à ceux décrits précédemment au sujet d'injections intrapéritonéales chez le cobaye.

Quel que soit donc le point d'inoculation, l'animal — lapin ou cobaye — réagit toujours de la même façon, par un appe actif des leucocytes aux point renfermant la leucotoxine.

Reste à déterminer la nature du facteur qui préside à ce phénomène.

Deux hypothèses peuvent être mises en avant : ou il s'agit d'une action directe de la leucotoxine sur l'appareil leucocytaire, ou bien d'une action indirecte par l'intermédiaire de l'antitoxine nouvellement formée.

1. Le sérum normal de cobaye donne parfois lieu à une légère hyperleucocytose non durable, due probablement à son faible pouvoir leucotoxique vis-à-vis des leucocytes de lapin.

Il est facile de prouver que la deuxième hypothèse est la moins probable : d'abord, parce qu'encore longtemps avant l'apparition de l'antileucotoxine, on observe des phénomènes d'hyperleucocytose dans le péritoine de cobayes ; puis, si c'était la production de l'antileucotoxine qui déterminait l'afflux leucocytaire, celui-ci devrait être très prononcé lorsqu'on fait des injections de sérum antileucotoxique dans la cavité péritonéale d'un cobaye neuf.

Or, l'expérience montre qu'il n'en est rien ; le sérum antileucotoxique, injecté dans un péritoine de cobaye, donne lieu tantôt à une hypoleucocytose persistante, tantôt à une hyperleucocytose transitoire, comme si l'on avait injecté du sérum d'un animal normal.

Ce n'est donc pas grâce à la présence de l'antileucotoxine que l'animal soumis à l'injection de leucotoxine manifeste une suractivité leucocytaire. Si nous mettons hors de cause cette hypothèse, il nous reste l'autre qui est plus probable, c'est-à-dire que l'hyperleucocytose que nous avons étudiée est due à l'excitabilité directe que la leucotoxine détermine dans le système leucocytaire, et que cette excitabilité rentre dans la catégorie des phénomènes de chimiotaxie positive et négative, alternant pour la même substance selon la quantité du poison présent.

Cette suractivité leucocytaire peut-elle être utilisée par l'animal en vue d'une lutte plus efficace contre différentes maladies infectieuses ? C'est là une des questions dont l'étude est en ce moment activement poursuivie dans le laboratoire de M. Metchnikoff.

Recherches sur l'action de l'hémotoxine sur l'homme.

Par MM. METCHNIKOFF et BESREDKA

Lorsqu'il a été bien établi que de faibles doses de cytotoxines provoquent chez les animaux de laboratoire une stimulation considérable, il est devenu très important d'établir si cette règle s'applique également à l'homme. Dans l'étude de cette question, on a rencontré d'abord la difficulté d'essayer sur l'homme des substances nouvelles de nature toxique. Comme il est impossible de déterminer *a priori* la dose à la fois inoffensive et active sur l'organisme humain, on comprend facilement l'hésitation qu'on a dû éprouver avant de risquer les premières tentatives.

Une circonstance favorable a pu lever tous les obstacles. Les succès de la sérothérapie de la diphtérie ayant encouragé les entreprises dans cette voie, plusieurs médecins se sont mis à préparer des sérums contre diverses maladies humaines dont le microbe est encore inconnu, ou n'a pu être cultivé dans des milieux artificiels, la syphilis, par exemple, le cancer, la lèpre. Dans ce but on prélevait des parties malades, ou du sang et du sérum humain, qu'on introduisait dans le corps des animaux d'expérience. On suivait, par conséquent, la méthode qui sert actuellement pour préparer des cytotoxines. De toutes ces tentatives la plus intéressante est celle qui a été dirigée contre la lèpre.

L'extension de cette maladie dans beaucoup de pays, jointe à l'impossibilité de la guérir par aucun médicament connu, suggéra l'idée de chercher le remède dans un sérum antilépreux. C'est M. le Dr Carrasquilla, à Bogota, qui a ouvert cette voie et a préparé un sérum, en injectant à des gros animaux du sang et du sérum sanguin provenant de lépreux. Comme les malades avaient paru bénéficier du traitement par ce sérum, plusieurs autres léprologistes se mirent également à préparer des sérums semblables. Parmi ces médecins, nous devons citer notamment

M. Laverde qui, dans deux publications[1], a donné beaucoup de détails importants sur la méthode de préparation du sérum antilépreux et aussi sur son action sur l'homme malade. Il injectait à des chevaux, ânes et brebis du sang entier, du sérum sanguin, du suc et des lépromes triturés, prélevés à des lépreux. Une fois, M. Laverde, au lieu de produits lépreux, injecta à une chèvre des fragments d'un épithélioma du col utérin. Le sérum fourni par tous ces animaux était injecté à des lépreux, le plus souvent à des doses de 10 à 20 c. c. à la fois.

M. Laverde, confirmant les données de son compatriote, M. Carrasquilla, signale chez ses malades une grande amélioration, allant quelquefois presque jusqu'à la guérison. Ses résultats ne pouvaient pas rester inaperçus ; on fit donc de nombreux essais de sérothérapie antilépreuse en Europe et dans des colonies. Lors du Congrès international des léprologistes à Berlin, en 1897, on a fait sur ce sujet plusieurs communications que nous devons résumer ici brièvement. Les rapports optimistes de MM. Carrasquilla et Laverde ont été confirmés par plusieurs autres léprologistes. MM. Buzzi, Abraham et Arning[2] ont obtenu des améliorations manifestes et plus ou moins durables, qui ne pouvaient être attribuées qu'à l'action favorable des sérums employés. Bientôt après le Congrès, les médecins français de la Nouvelle-Calédonie furent tellement surpris, à la suite des injections du sérum de Carrasquilla, par l'amélioration considérable des lépromes, qu'ils se décidèrent à créer à Nouméa un service sérothérapique particulier[3].

Mais plusieurs autres savants, des plus autorisés, se sont nettement prononcés, au Congrès, contre la sérothérapie antilépreuse[4]. M. Hallopeau n'a obtenu que des résultats peu marqués chez quelques lépreux, tandis que trois autres malades ne présentèrent absolument aucune amélioration de leur état. M. Dehio a déclaré que l'effet du traitement des lépreux dans les provinces baltiques en Russie, avec un sérum préparé sur place d'après la méthode de Carrasquilla, fut tout à fait nul. M. Brieger

1. Voir surtout ses travaux sur le traitement de la lèpre par la sérothérapie. Paris, 1897.
2. *Mittheilungen und Verhandlungen der internationalen wissenschaftlichen Lepra Conferenz*, Berlin 1898, t. II, pp. 37, 145, 148, 154, 156.
3. Auché. *La lèpre en Nouvelle-Calédonie*, Paris 1899.
4. *L. c.*, pp. 147, 151, 155, 156, 158. T. III, p. 599.

arriva à un résultat semblable, qu'il explique par l'absence de base scientifique de la méthode de Carrasquilla. Pour M. Brieger, l'injection aux animaux de sérum lépreux ne peut aboutir à aucun résultat, parce que ce sérum est rapidement éliminé de l'organisme. On ne sait même pas si le sérum antilépreux renferme des toxines ou des antitoxines. M. Neisser, qui a une si grande part dans nos connaissances actuelles sur la lèpre, se rallie à l'opinion de M. Brieger, et insiste sur le peu d'espoir qu'on doit avoir en une sérothérapie de la lèpre. On n'a même pas le droit d'affirmer, d'après lui, que le sérum des animaux, traités avec des produits lépreux, possède des qualités particulières.

Ces échanges d'opinions n'ont pas seulement leur valeur, mais peuvent servir encore pour mettre en relief, dans un cas tout spécial, l'importance de la découverte des cytotoxines. Maintenant que nous savons que l'injection du sérum, du sang ou d'autres éléments cellulaires à un animal provoque la formation des cytotoxines, personne ne pourra plus soutenir l'absence de changements survenus dans l'organisme des animaux traités par des produits lépreux. Les sérums, préparés d'après les méthodes de Carrasquilla et Laverde, contiennent sûrement une ou plusieurs cytotoxines. Les sérums, obtenus après l'injection du sérum des lépreux ou du suc et des produits des lépromes, doit inévitablement contenir de la leucotoxine humaine. Les sérums obtenus par M. Laverde, chez ses animaux injectés avec du sang entier de lépreux, doit, en dehors de la leucotoxine, renfermer encore une grande quantité d'hémotoxine. Aussi il n'est pas étonnant que dans quelques cas, après des injections de doses fortes et répétées, M. Laverde obtint un effet nuisible (quoique passager) qui se manifesta entre autres par « des symptômes visibles d'anémie, due probablement à la dissolution des globules rouges du sang ». (*L. c.*, p. 21.)

Mais, tandis que les sérums préparés pour combattre la lèpre renferment sûrement des cytotoxines, il est impossible d'admettre qu'ils contiennent des produits lépreux intacts ou modifiés. M. Brieger, au Congrès de 1897, a insisté déjà sur l'absence d'une toxine lépreuse dans le sang des malades. Les bacilles eux-mêmes sont absents ou très rares dans ce milieu. Mais, et cet argument est décisif, M. Laverde a obtenu le même

degré d'amélioration avec des sérums, préparés par des injections de sang lépreux ou des lépromes, et avec un autre sérum, préparé avec un épithélioma du col de l'utérus. La chèvre qui avait été traitée avec cette tumeur, ne pouvait nullement recevoir de produits lépreux, mais elle renfermait sûrement des cytotoxines humaines. C'est donc à ces poisons cellulaires qu'il faut attribuer les améliorations, observées par tant d'observateurs, chez les lépreux soumis à la sérothérapie, améliorations dont il est impossible de nier la réalité. En faveur de cette thèse plaident non seulement les succès, mais aussi les échecs du traitement de la lèpre par les sérums cytotoxiques. On sait que, contrairement aux antitoxines, les toxines en général et notamment les cytotoxines sont des corps très peu stables. Elles s'atténuent ou se détruisent avec le temps, et sont facilement altérées par toute sorte de facteurs. La conservation prolongée et le voyage de Colombie en Europe, ou l'addition d'acide phénique à des sérums fraîchement préparés, (comme dans le cas de M. Dehio) peuvent sensiblement affaiblir ou totalement éliminer les cytotoxines, et il n'est point étonnant que dans ces conditions leur effet soit nul.

Toutes ces considérations nous ont amené à cette supposition que l'effet favorable du traitement des lépreux par des sérums doit être attribué non à des produits quelconques du bacille de Hansen, mais à des cytotoxines, développées dans l'organisme animal à la suite d'injections du sang ou des tissus humains. D'un autre côté, les recherches nombreuses exécutées par des léprologistes avec des sérums sûrement cytotoxiques, nous ont conduit à ce résultat que des essais d'injections de sérums hémotoxiques et leucotoxiques peuvent être tentés sur l'homme.

Dans cet espoir, nous nous sommes mis à préparer, à partir du commencement de l'année courante, une chèvre avec du sang défibriné [1]. Après 36 jours de ce traitement, le sérum sanguin de la chèvre s'est montré incomparablement plus agglutinant et hémolytique qu'il n'était avant la première injection du sang humain. Ainsi 10 volumes de sérum, pris avant le traitement, n'étaient pas capables d'agglutiner ni de dissoudre les

1. Ce sang provenait de malades du service de M. le Dr Vaquez (auquel nous exprimons nos vifs remerciements) ou bien du placenta des femmes accouchées.

hématies contenues dans 1 volume de sang humain après 1 h. 20 de contact, tandis que, après avoir reçu en tout 34 c. c. de sang humain, un volume de sérum agglutinait, dans un volume de sang, toutes les hématies au bout de quelques secondes, et les dissolvait totalement en 7 minutes. C'est avec ce sérum hémolytique que nous avons fait notre première injection à l'homme. Nous avons demandé à MM. les docteurs Hallopeau et Ducastel de nous permettre d'injecter quelques-uns des lépreux de leurs services. Ces savants ont consenti d'autant plus volontiers que, dans l'intérêt de leurs malades, il est très important d'établir les propriétés des substances qui se trouvent dans les sérums qu'on prépare avec des produits humains, et qu'on injecte dans l'intention de guérir la lèpre.

Pour commencer, nous avons pendant plusieurs jours déterminé le nombre de globules rouges et la quantité d'hémoglobine dans le sang de deux lépreux adultes de sexe masculin, atteints de lèpre tuberculeuse à un degré assez avancé [1]. Le sixième jour après la première prise de sang, nous injectâmes à l'un de nos malades 0,5 c. c. de sérum de la chèvre préparée (chèvre n° 1) et à l'autre 0,5 c. c. de sérum d'une vieille chèvre n° 2), qui n'avait jamais été traitée avec du sang humain, mais dont le sérum s'est montré tout de même un peu hémolytique pour l'homme [2].

Nous avions pensé que de si petites doses, sûrement incapables d'occasionner le moindre inconvénient à nos malades, ne seraient pas non plus capables de produire un changement tant soit peu notable dans la teneur du sang en globules rouges et en hémoglobine. Et cependant l'observation, poursuivie pendant plusieurs jours, nous montra que dans les deux cas il s'est produit une augmentation d'hématies très marquée, et aussi un certain accroissement dans la quantité d'hémoglobine. Ce premier résultat nous engagea à continuer l'injection des petites doses (1 à 3 c. c.) des mêmes sérums. Dans la suite nous pûmes facilement constater que même le sérum plus fort de la chèvre pré-

1. Toutes nos numérations des hématies ont été exécutées avec l'hématimètre de M. Malassez (modèle modifié par son auteur) et le titrage d'hémoglobine avec l'appareil de Gowers, de Berne.

2. Dans un mélange de 2 volumes de sérum de la chèvre n° 2 avec 1 volume de sang humain les hématies sont rapidement agglutinées, mais leur dissolution est partielle, même après 45 heures.

parée (n° I) ne produisait aucun symptôme fâcheux et était très bien supporté par nos malades.

Nous prîmes donc la décision de n'injecter que du sérum de la chèvre n° I. Ces injections ont été faites à plusieurs reprises pendant plus de trois mois (v. l'Appendice, n^{os} I et II). La dose la plus forte n'était que de 7 c. c. Les deux malades affirmèrent avoir ressenti une douleur quelquefois assez vive, mais toujours de courte durée, après quelques injections du sérum de la chèvre n° I. En même temps ils déclarèrent se sentir mieux au point de vue des douleurs névralgiques. Un des deux lépreux notamment, qui devait souvent recevoir des piqûres de morphine pour calmer ces douleurs, bientôt après le commencement du traitement par le sérum, put se passer des injections calmantes de l'alcaloïde. D'un autre côté, quelquefois, à la suite du sérum, il se produisait autour de quelques lépromes, parmi les plus récents, une congestion intense avec suppuration abondante. Dans ce pus l'examen bactériologique ne révélait qu'une grande quantité de bacilles lépreux, contenus dans l'intérieur des phagocytes, et aucun autre microbe.

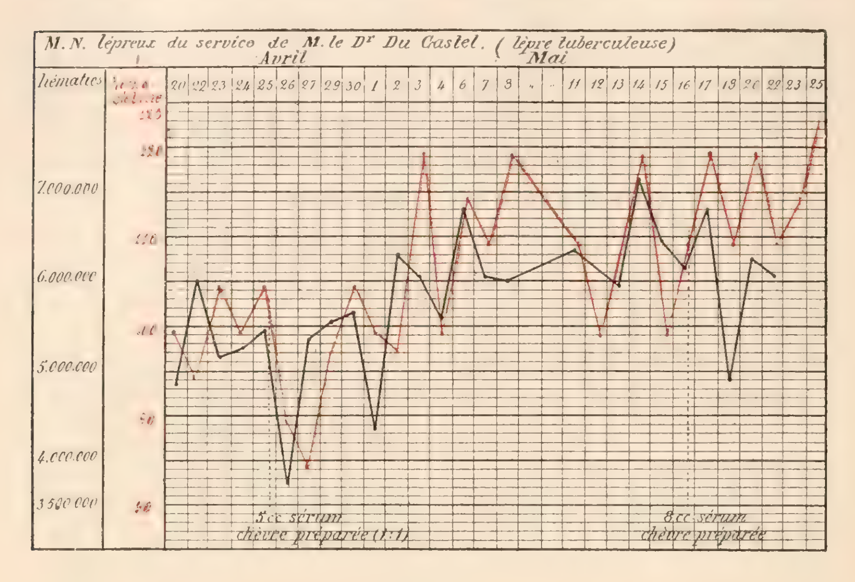
La suppuration aboutissait à la formation d'une eschare qui se détachait dans la suite. Ces phénomènes rappellent les changements décrits par les léprologistes qui avaient pratiqué le traitement par les sérums antilépreux de Carrasquilla et Laverde. Ainsi M. Arning a été frappé de l'amélioration dans l'état de son malade, accompagnée d'ulcération des nodules lépreux, avec écoulement d'un pus ne renfermant que des bacilles de Hansien. Ces ulcérations guérirent avec une grande rapidité.

Le mouvement fébrile chez nos malades était rare, insignifiant et de courte durée.

Quoique l'effet favorable du sérum sur la lèpre fût dans nos cas beaucoup moins prononcé que dans les exemples décrits par Carrasquilla et Laverde, néanmoins on a le droit de conclure que la réaction de leurs sérums et des nôtres présentait une grande analogie. La différence de degré s'explique facilement par la quantité de sérum beaucoup plus faible que nous injections à nos malades. Au lieu de commencer par 10 et même 20 c. c., comme le faisait le Dr Laverde, nous injections de 0,5 à 7 c. c. de notre sérum.

Les faits que nous venons de résumer constituent donc un

nouvel argument en faveur de notre thèse, que l'amélioration qu'on obtient chez des lépreux, avec des sérums, est due non à des produits du bacille de Hansen, mais bien aux cytotoxines que renferment ces sérums. Parmi ces poisons cellulaires, la première place doit être attribuée à la leucotoxine. On a constaté

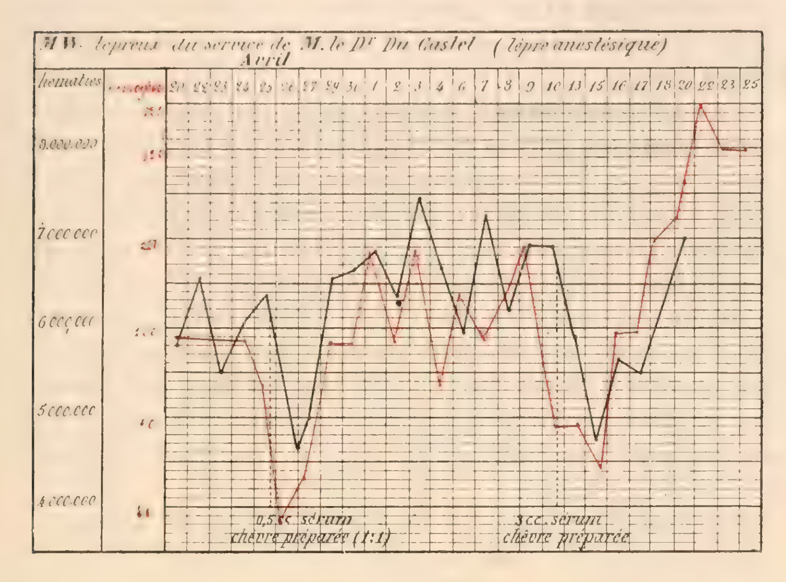


Tracé n° 1.

le même degré d'amélioration chez des lépreux, traités avec du sérum des animaux, préparés avec du sang entier, et chez des malades, inoculés avec du sérum, préparé exclusivement avec du sérum sanguin de l'homme. Eh bien, le premier sérum doit renfermer beaucoup et le deuxième sérum très peu ou pas du tout d'hémolysine. Ce n'est donc pas ce poison qui agit contre la lèpre. Par contre, dans les sérums, obtenus après des injections du sang entier ou seulement du sérum sanguin, il se développe à peu près la même quantité de leucotoxine[1]. Comme le sérum de notre chèvre n° I a manifesté une action analogue, quoique moindre, sur les lépromes, il a fallu établir si lui aussi renferme de la leucotoxine humaine. L'examen direct nous a révélé que dans le mélange d'un volume de ce sérum avec la

1. Voir à ce sujet les faits rapportés par M. Delezenne dans sa première note sur le sérum leucolytique, dans les *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 2 avril 1900.

même quantité de sang humain, les leucocytes sont détruits après un quart d'heure. Ils sont devenus ronds et transparents et leur noyau très visible. Dans le sérum d'une chèvre neuve, les leucocytes humains, même au bout de 3 heures, ont conservé leur aspect normal.



Tracé n° 2.

Dans le courant de nos observations, nous avons suivi les variations quotidiennes du taux des globules rouges et d'hémoglobine chez les deux lépreux. Sous ce rapport le résultat a été des plus concluants. Les injections répétées des petites doses du sérum hémolytique augmentent l'hématopoïèse, d'une façon analogue à ce qui a été établi par M. Cantacuzène pour le lapin. Comme il a été depuis longtemps constaté par plusieurs hématologues, c'est l'hémoglobine qui donne des résultats plus constants et plus précis que les hématies. Cette conclusion découle aussi de nos observations.

Cinq semaines après les premières injections de sérums hémolytiques à nos deux lépreux, nous leur avons prélevé un peu de sang, dans le but de rechercher si leur sérum a acquis une propriété antihémolytique. Le résultat fut positif. Le sérum des deux malades a manifesté une action nettement antitoxique

vis-à vis de l'hémotoxine humaine. Cette action a été plus forte que celle du sérum humain normal. Le sérum du premier des lépreux (qui reçut plus de sérum de la chèvre n° 1) s'est montré plus antihémolytique que celui du second malade, injecté souvent avec le sérum de la chèvre n° 2. Eh bien, malgré ce pouvoir antitoxique du sang, nos lépreux continuèrent à réagir, après des nouvelles injections de sérum, par l'augmentation de l'hématopoièse.

Un troisième lépreux, dans un état très avancé, exigeait encore beaucoup plus de ménagements et de prudence que les deux premiers. Nous nous décidâmes par conséquent à ne lui injecter pendant plusieurs semaines que du sérum faiblement hémolytique de la chèvre n° 2, de 0,75 c. c. à 3 c. c., après quoi nous lui fîmes une injection d'un demi c. c. et plus tard d'un c. c. de sérum de la chèvre n° 1. Ici encore l'accroissement de l'hématopoièse, surtout pour ce qui concerne l'hémoglobine, s'est manifesté d'une façon non douteuse. Mais, bien entendu, chez ce malade il n'a pu être question d'influencer tant soit peu son processus lépreux très avancé, avec les doses minimes de sérums hémolytiques.

Un quatrième lépreux du service de M. Hallopeau, un Canaque, atteint de lèpre tuberculeuse avancée, n'a pu recevoir qu'une seule injection, vu l'état précaire de sa santé générale. Il n'a pu, par conséquent, nous fournir aucun résultat dans nos recherches.

En résumant les conclusions principales qui découlent de nos premiers essais d'injections de sérums cytotoxiques chez l'homme, nous devons considérer d'abord comme très probable que l'effet favorable des sérums antilépreux doit être attribué à la leucotoxine. Celle-ci se développe à la suite de l'introduction dans l'organisme animal de produits leucocytaires humains. La leucotoxine, injectée à dose convenable, doit produire une excitation du système phagocytaire, analogue à celle qui a pu être démontrée par les expériences directes de l'un de nous (Besredka) sur les lapins et les cobayes. Il est extrêmement probable que cette excitation contribue à une réaction phagocytaire plus active vis-à-vis du bacille lépreux, réaction qui se traduit par une suppuration et une élimination abondante de

ces microbes. L'hémotoxine ne doit au contraire jouer aucun rôle favorable dans la lèpre, et son action hémolytique empêche l'emploi des doses suffisantes de sérum. Il en résulte que les sérums antilépreux doivent être préparés dorénavant non plus avec du sang entier, mais seulement avec du sérum sanguin ou, mieux encore, avec des ganglions lymphatiques d'homme, injectés à des animaux. C'est ce que nous essayons à réaliser dans le but d'obtenir un sérum leucotoxique efficace.

Nos injections à des lépreux ont démontré l'accroissement de l'hématopoièse, à la suite de petites doses répétées de sérum hémolytique. Ce résultat, présentant une grande importance au point de vue général, a dû être vérifié par une expérience rigoureuse. Après avoir établi qu'on peut sans le moindre danger injecter d'emblée plusieurs c. c. de sérum de la chèvre n° 1, nous nous sommes décidés à faire un essai comparatif sur l'effet de doses faible et moyenne. Deux lépreux du service de M. le D[r] Ducastel, à Saint-Louis, encouragés par l'exemple des malades du service de M. le D[r] Hallopeau, ont manifesté le désir d'être à leur tour inoculés avec notre sérum. Le premier, atteint d'une lèpre anesthésique contractée à la Guadeloupe, reçut, après qu'on eût déterminé pendant 5 jours son taux normal de globules rouges et d'hémoglobine, un 1/2 c. c. de sérum n° 1. Le second, un lépreux tuberculeux avancé, fut en même temps injecté avec 5 c. c. du même sérum. Chez les deux malades il se produisit d'abord une diminution considérable d'hématies et d'hémoglobine, qui persista peu de jours. Les deux valeurs remontèrent bientôt à la normale et la dépassèrent, d'une façon plus forte chez le deuxième lépreux. Il suffit de jeter un coup d'œil sur les deux courbes 1 et 2 pour se rendre compte de l'effet produit par la première injection de sérum. Chez le lépreux qui avait reçu la faible dose, l'augmentation de l'hématopoièse s'est maintenue pendant quelques jours pour faire place à des valeurs voisines de la normale. Chez le second, injecté avec une plus forte dose de sérum, l'accroissement de l'hématopoièse a pu au contraire, être constatée pendant deux semaines, sans compter les faibles oscillations dans la quantité d'hématies et d'hémoglobine.

Lorsque chez le premier lépreux il se manifesta un abaissement de l'hématopoièse d'une façon suffisamment nette, on lui

fit une seconde injection du même sérum, en quantité de 3 c. c.. Celle-ci fut encore suivie d'une chute assez marquée d'hématies et d'hémoglobine, mais six jours après, ces éléments commencèrent leur ascension qui dépassa celle qui était survenue après la première injection. En étudiant la courbe n° 1, il est impossible de méconnaître le rapport étroit et causal entre l'introduction de sérum et les variations de l'hématopoièse. Cette conclusion est corroborée par les chiffres, recueillis chez notre second lépreux. On lui fit une deuxième injection (8 c. c.) au moment où le nombre de globules rouges était encore assez élevé et la quantité d'hémoglobine considérable. Eh bien, malgré cette circonstance, capable de masquer le résultat, la seconde injection fut suivie d'un accroissement encore plus considérable d'hémoglobine. Les globules rouges, élément en général bien moins précis que l'hémoglobine, pendant les premiers jours après la deuxième injection, accusent plutôt une diminution passagère.

Les deux derniers lépreux qui servirent pour contrôler les résultats, obtenus précédemment, ont donc fourni une confirmation nouvelle de cette règle générale que *les faibles doses de cytotoxines produisent une suractivité des éléments cellulaires correspondants.* En présence de ce fait, nous avons jugé utile de communiquer dès à présent nos observations, sans attendre la fin de nos autres recherches dans la voie ouverte par la découverte des poisons cellulaires.

D'après tout ce qui a été dit, il est tout naturel de se poser les questions suivantes : comment agissent les sérums leucotoxiques, dépourvus d'hémotoxine, sur certaines maladies chroniques et rebelles, comme la lèpre ? Les sérums hémotoxiques sont-ils capables d'augmenter aussi l'hématopoièse chez des personnes atteintes d'anémies diverses? Ces questions, comme une série d'autres qui s'y rattachent, sont en ce moment à l'étude à l'Institut Pasteur.

En terminant cette note, nous exprimons nos plus vifs remerciements à M. le Dr Hallopeau, qui nous a autorisé à faire des injections et à travailler dans son service à Saint-Louis, et à M. le Dr Ducastel, qui a mis à notre disposition deux de ses malades.

Appendice I.

M. M., 42 ans, lépreux du service de M. le Dr Hallopeau.

Dates.	Nombre d'hématies d. un mill. c. en millions	Hémog.	Injections.
Février.			
14	6,30	73	
17	6,09		
19	6,20	80	0,5 c.c. sér. n° I.
20	7,50		
21	6,30	88	
22	5,70		
23	6,36		1 c.c. sér. n° I.
24	5,80		
25	5,38		
26	6,26		
27	5,78		
28	6,80		
Mars.			
1	6,20		
2	5,48		
3	5,86		
4	5,90		1 c.c. sér. n° I.
5	5,44		
6	8,30		
7	5,96		
8	5,76		
9	6,30		
10	6,14		
11	5,30		
12	5,88		
13	6,42	85	
14	5,26		2,5 c.c. sér. n° II.
15	4,92		
16	5,84		
17	5,88	98	
18	5,12		
19	6,30		
20	5,18		
21	5,16		3 c.c. sér. n° II.
22	6,30		
23	5,52		
24	5,36		
25	4,82		
26	5,84	100	
27	6,16		
28	5,86		
29	5,30	95	1 c.c. sér. n° I.
30	5,98		
Avril.			
1	5,92	110	
2	5,28	110	
3	6,20	110	
4	6,44	110	
5	»	100	
6	6,30	120	
8	5,86	105	
9	6,38	100	
10	6,06	105	
11	5,96	97	3 c.c. sér. n° I.
12	4,96	105	
13	6,46	105	
15	5,58	105	
16	4,92	105	
17	5,96	105	
18	6,34	105	
19	6,04	100	
20	5,58	102	
22	7,20	115	
23	5,68	115	
24	6,00	110	
25	6,72	110	
26	6,54	90	
27	6,34	90	
29	5,94	120	
30	»	100	
Mai.			
1	6,94	105	
2	6,26	95	
3	6,18	118	
4	6,12	105	
6	6,16	110	
7	6,32	110	
8	6,18	110	7 c.c. sér. n° I.
9	5,30	110	
10	6,40	100	
11	6,82	95	
13	5,76	90	
14	7,06	115	
15	6,22	105	
16	6,46	105	
17	5,98	115	
18	6,54	120	
20		110	
22		95	
23		115	

Appendice II.

M. B., 34 ans, lépreux du service de M. le Dr Hallopeau.

Février.			
14	6,02	82	
17	5,52		
19	5,14	82	0,5 c.c. sér. n° II.
20	6,90		
21	6,98	80	
22	6,44		
23	7,47		
24	5,60		
25	7,08		
26	7,16	95	
27	6,82		
28	6,88		
Mars.			
1	7,48		
2	4,92		

Dates.	Nombre d'hématies d. un mil. c.	Hémog.	Injections.
3	5,60		1 c.c. sér. n° II.
4	5,94		
5	5,38		
6	6,08		
7	5,78		
8	6,24		
9	6,54		
10	5,66		
11	5,84		
12	6,58		
13	5,54	105	
14	5,78		
15	5,92		
16	5,50		
17	5,90	85	
18	7,70		
19	5,94		
20	6,26		
21	4,54		
22	5,58		
23	5,80		
24	4,68		
25	4,08		
26	6,14	90	
27	4,78		
28	5,94		
29	6,18	80	1 c.c. sér. n° I.
30	6,10		
Avril.			
1	6,44	85	
2	5,54	90	
3	4.20	100	
4	5,48	105	
5	4,96	85	
6	6,80	95	
10	5,72	90	
11	5,74	95	
12	6,90	100	
13	6,54	95	
15	7,06	90	
16	5,34	95	4 c.c. sér. n° I.
17	7,72	110	
18	6,52	110	
19	5,68	95	
20	7,36	110	
22	5,38	95	
23	6,50	115	
24	6,12	100	
25	6,00	110	
26	5,64	90	
27	5,32	90	
28	7,12	115	
30		95	
Mai.			
1	6,24	95	
2	6,84	95	
3	6,56	105	
4	5,32	90	
6	6,72	100	
7	6,70	100	
8	6,38	95	7 c.c. sér. n° I.
9	7,28	115	
10	6,94	100	
11	6,04	90	
13	5,90	90	
14	7,90	110	
15	5,58	100	
16	7.26	95	
17	6,42	95	
18	7,16	100	
20		100	
22		90	
23		95	

NOTE SUR L'ÉLIMINATION DES BACTÉRIES
PAR LES REINS ET LE FOIE

Par LE Dr MÉTIN

Médecin principal des colonies.

La question de l'élimination des bactéries par les organes glandulaires a été l'objet d'assez nombreux travaux, dont on trouvera l'historique détaillé dans le numéro XXXIII, 2, du *Zeitschrift für Hygiene und Infectionskrankheiten*. Tous les auteurs s'accordent à reconnaître que les glandes salivaires normales sont imperméables aux microorganismes ; mais ils diffèrent d'avis pour ce qui concerne le foie et les reins.

Les uns, parmi lesquels Bield et Krauss, Pawlosky, prétendent que les reins et le foie laissent passer tous les corps étrangers qui circulent dans le sang, alors même qu'il n'y a pas d'altération dans la structure de ces organes.

Les autres, avec Wyssokowitch, Opitz, Carl et Klecki, arrivent au contraire à cette conclusion que s'il y a élimination des bactéries par les urines ou par la bile, cela est dû nécessairement à des modifications survenues daus les parois vasculaires du rein ou du foie.

En d'autres termes, l'élimination des bactéries serait pour les uns une fonctions physiologique, et pour les autres un phénomène d'ordre pathologique.

Sur les conseils et les indications de MM. Roux et Metchnikoff, que nous prions d'agréer l'expression de notre profonde reconnaissance, nous avons institué deux séries d'expériences pour la solution de cette question d'un si grand intérêt théorique et pratique. Dans l'une, nous nous sommes servi du lapin, à qui nous inoculions dans les veines du *b. subtilis*, du *staphylococcus aureus*, du pyocyanique, du *b. prodigiosus*, du *bacillus anthracis*, ou du bacille typhique. Dans l'autre, nous nous sommes adressé au cobaye, et nous avons employé la voie sous-cutanée et les même microbes. Au début, nous nous servions de cultures en bouillon de ces diverses bactéries ; mais nous avons peu après

remplacé ce liquide par une dilution en eau physiologique de corps microbiens cultivés 24 heures sur gélose. Nous raclions un tube de gélose et nous mélangions le produit du raclage dans 10 c. c. d'eau physiologique. Les doses ont varié de 1/5 de c. c. à 2 c. c. sans que les suites aient été différentes.

Dans ces recherches nous sommes arrivé tout d'abord à des résultats contradictoires ; mais un examen attentif nous a prouvé que c'était une question de technique. Que l'on puise l'urine par le cathétérisme de l'urètre, ou par celui de l'urétère, ou qu'on l'aspire directement dans la vessie par la ponction au moyen de l'aiguille de la seringue chez l'animal vivant ou sur le cadavre, il est absolument nécessaire d'opérer d'une façon telle qu'il ne se trouve pas de sang, en si petite quantité que ce soit, dans l'urine ainsi puisée. Si le cathétérisme a éraillé la muqueuse, ou si l'aiguille, en ponctionnant la vessie, a traversé un capillaire, l'urine recueillie amène avec elle une quantité de sang, infime à la vérité, mais suffisante pour donner lieu quelquefois à une culture du microbe qu'on avait préalablement introduit dans l'organisme. Dans ces conditions on serait tenté de conclure à l'élimination physiologique des bactéries, le microscope ne décélant aucune altération vasculaire dans les vaisseaux du rein.

Après de nombreux tâtonnements, nous sommes arrivé à procéder de la façon suivante :

Chez l'animal vivant, nous faisions une laparotomie permettant d'attirer en dehors la vessie, que nous laissions reposer sur du papier stérilisé pendant la durée de l'expérience. Pour puiser l'urine au moyen de la seringue stérilisée, nous choisissions un endroit paraissant peu vascularisé, et nous faisions la ponction avec une aiguille très fine après avoir eu soin de brûler avec un fer rouge la paroi vésicale, pour être sûr de rétracter les capillaires qui auraient pu se rencontrer sur notre route. L'animal qui nous avait ainsi servi pour quelques prises d'urine était sacrifié vers la deuxième heure après le début de l'expérience.

Chez le cadavre, nous ouvrions largement la vessie au moyen d'un scalpel rougi au feu, et, les deux lèvres de la plaie étant écartées par des pinces, nous aspirions l'urine au moyen d'une pipette mousse, stérilisée. Nous procédions de cette façon pour recueillir la bile.

Nous avons ainsi puisé de la bile ou de l'urine à des intervalles divers après l'injection des bactéries, à partir d'un quart d'heure jusqu'à 26 heures. Nous ensemencions la bile ou l'urine sur gélose, répartissant invariablement 10 gouttes de liquide sur un tube à chaque expérience.

Les résultats de nos expériences sont consignés dans les tableaux suivants :

B. Subtilis.

Lapin 1. — Reçoit dans la veine 1 c. c. de culture en bouillon de *bacillus subtilis* de 24 heures. Aux intervalles ci-après, prise directe de l'urine par ponction de la vessie après laparotomie et cautérisation ignée de la paroi vésicale.

	X gouttes d'urine.	X gouttes de bile.	Observations.
15 minutes après l'injection.	0	»	
1/2 heure —	0	»	
1 heure —	0	»	
2 heures —	0	0	L'animal est sacrifié pour cette expérience.

Lapin 2. — Mêmes détails que ci-dessus.

	X gouttes d'urine.	X gouttes de bile.	
3 heures après l'injection.	0	»	
4 heures —	0	»	
5 heures —	0	0	Même observation.

Lapin 3. — Mêmes détails.

10 minutes après l'injection, le lapin est sacrifié, et l'urine et la bile sont retirées avec les mêmes précautions que dans les expériences précédentes. Les tubes d'ensemencement restent stériles.

Lapin 4. — Cet animal reçoit dans la veine 5 c. c. de culture en bouillon de *b. subtilis* âgée de 24 heures.

24 heures après l'injection, prise de l'urine après laparotomie et avec les mêmes précautions : les tubes d'ensemencement restent stériles. 26 heures après l'injection, le lapin est sacrifié : l'urine et la bile recueillie avec le procédé ci-dessus ne donnent aucune culture.

Staphylococcus aureus.

Lapin 5. — On inocule à ce lapin, dans la veine de l'oreille, 2 c. c. de culture en bouillon de *staphylococcus aureus* âgée de 24 heures. L'urine est retirée par cathétérisme de l'urètre aux intervalles suivants :

	Urine.	*Bile.*	*Observations.*
10 minutes après l'injection.	0	»	
20 — —	0	»	
30 — —	4 colonies	»	L'urine est légèrement teintée de sang.
1 heure après l'injection.	0	0	Pour cette expérience l'animal est sacrifié et l'urine prise directement dans la vessie.

Dans cette expérience, nous voyons qu'une demi-heure après l'injection nous avons obtenu 4 colonies de staphylocoque ; mais à l'autopsie de l'animal sacrifié, 1 heure après l'injection, nous voyons dans l'urètre une petite éraillure produite par le cathétérisme ; d'ailleurs l'urine ensemencée renfermait quelques globules sanguins. L'urine prélevée directement dans la vessie aussitôt après avoir sacrifié l'animal était stérile.

Lapin 6. — Même dose injectée. L'urine est puisée directement dans la vessie après laparotomie, et après cautérisation de la paroi vésicale.

	Urine.	*Bile.*	*Observations.*
10 minutes après l'injection.	0	»	
30 — —	0	»	
1 heure —	0	»	
2 heures —	0	»	Pour cette expérience le lapin est sacrifié.

Lapin 7. — Mêmes détails que pour le précédent.

	Urine.	*Bile.*	
4 heures après l'injection.	0	»	
5 — —	0	»	
6 — —	0	0	Pour cette expérience le lapin est sacrifié.

Charbon.

Lapin 8. — On injecte dans la veine de ce lapin 1/5 de c. c. d'une émulsion en eau physiologique de culture de charbon sur gélose : 1 tube pour 10 grammes d'eau. L'urine est puisée directement dans la vessie après laparotomie et cautérisation de la paroi vésicale.

	Urine.	*Bile.*	
10 minutes après l'injection.	0	»	
20 — —	0	»	
30 — —	0	»	
1 heure —	0	0	Pour cette expérience le lapin est sacrifié.

Lapin 9. — Mêmes détails.

15 minutes après l'injection, le lapin est sacrifié : La bile et l'urine ne donnent aucune culture.

Lapin. 10. — Mêmes détails.

	Urine.	*Bile.*	
24 heures après l'injection.	nombreuses	»	L'urine est sanguinolente.
26 — —	—	—	— —
27 — —	—	0	Pour cette expérience le lapin est sacrifié.

Lapin 11. — Mêmes détails de l'expérience.

Nous laissons ce lapin sans lui prendre d'urine pendant la vie. A la mort,

survenue 36 heures après l'inoculation, nous ponctionnons la vessie et la vésicule biliaire avec les mêmes précautions que dans les expériences précédentes : les tubes ensemencés avec l'urine renferment de très nombreuses colonies de charbon. Les deux tubes ensemencés avec la bile restent stériles.

Avec le charbon, qui donne des lésions dans les reins, on obtient donc, environ vers la 24ᵉ heure, des cultures avec l'urine, tandis que la bile est stérile. Toutes nos expériences faites avec le charbon nous ont donné ces mêmes résultats.

Enfin les expériences faites dans les mêmes conditions que précédemment avec le bacille typhique, le *b. prodigiosus*, le pyocyanique ont été suivies des mêmes conclusions : stérilité de l'urine et de la bile dans les tubes d'ensemencement.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons choisi le cobaye et la voie sous-cutanée. Nous injections des émulsions de cultures sur gélose en eau physiologique, et nous avons observé chaque fois la stérilité de l'urine et de la bile, lorsqu'il n'y avait pas de sang dans le liquide ensemencé.

De ces expériences, il est permis de conclure :

1° Les reins et le foie sont imperméables aux bactéries introduites dans l'organisme soit par la voie sous cutanée, soit par la voie intraveineuse ;

2° Lorsque les tubes d'ensemencement contiennent des colonies du microbe injecté, c'est qu'il y a eu dans le liquide ensemencé une certaine quantité de sang, indice d'une lésion vasculaire ou épithéliale, mécanique ou chimique.

SUR LA PROTÉASE DE L'ASPERGILLUS NIGER

Par le Dr G. MALFITANO

DEUXIÈME MÉMOIRE

Travail du laboratoire de M. Duclaux.

Dans un travail précédent [1], j'ai étudié, dans ses rapports avec la cellule qui la produit, une diastase dont je voudrais étudier aujourd'hui les conditions d'action en dehors de la cellule. Pour simplifier, je l'appellerai protéase, parce qu'elle s'attaque aux matières protéiques. Ces matières ne sont pas encore assez bien spécifiées pour qu'on puisse spécialiser leurs diastases, comme on a commencé à le faire pour les sucres. Il vaut donc mieux, jusqu'à plus ample informé, conserver le nom de protéase. Une étude approfondie des conditions de température et de milieu qu'elle préfère ou dont elle souffre nous dira si elle est une ou multiple. Appliquons-lui donc les méthodes qui, jusqu'ici, se sont montrées les plus efficaces pour l'étude des autres diastases.

M. Fernbach, dans son étude de l'influence de la réaction sur l'amylase du malt, a introduit sur ce sujet une précision remarquable en tenant compte de l'état des phosphates du milieu, et j'ai fait bénéficier toutes mes recherches sur la protéase de cette indication précieuse.

Je chercherai ensuite à définir l'action de la protéase par la nature des substances attaquées et des produits élaborés. Enfin j'aborderai la comparaison de cette diastase avec les autres, mieux connues, comme la pepsine, la pancréatine et la papaïne.

I

PRÉPARATION ET ÉTUDE DES SOLUTIONS DE PROTÉASE

Une méthode avantageuse et rapide pour se procurer des préparations actives des diastases de l'*A. niger*, consiste à faire

1. Ces *Annales*, t. XIV, p. 60.

macérer du mycélium sec et finement moulu, et à en exprimer le liquide, qui, après filtration, est précipité par l'alcool.

On peut opérer en tout comme pour la préparation de l'amylase du malt.

Pour la diastase protéolytique, il est préférable de s'adresser à du mycélium récolté au moment de la sporulation, et rapidement séché à l'étuve à 35°.

L'expérience suivante peut donner une idée de la quantité de diastase que l'on peut retirer du mycélium récolté aux divers âges de la culture.

Expérience I. — On prend quatre échantillons de mycélium sec, provenant de cultures interrompues à des âges différents. On les réduit en poudre très fine, et on en détermine l'humidité et les cendres. On prélève alors de chacun exactement 10 grammes, qu'on met à macérer dans 100 c. c. d'eau chloroformée.

Après 6 heures, on exprime le liquide de macération au moyen d'un linge et on le filtre sur papier.

Dans les quatre solutions obtenues, on détermine la teneur en substances fixes et le pouvoir protéolytique.

Voici les résultats : L'acidité est mesurée avec la phénolphtaléine, et évaluée en c. c. d'une solution décinormale de soude pour 100 c. c. Les temps nécessaires à la liquéfaction de la gélatine dans les conditions indiquées au mémoire précédent sont évaluées en heures et représentées par la lettre T.

EXAMEN DU MYCÉLIUM RÉCOLTÉ A L'AGE DE

	I 24 heures.	II 48 heures.	III 72 heures.	IV 240 heures.
Aspect.	Poudre blanc-jaunâtre	Blanche.	Grise.	Noire.
	—	—	—	—
Humidité 0/0	5,2	3,4	4,6	5,0
Cendres 0/0	5,5	4,3	2,9	7,2

EXAMEN DES LIQUIDES DE MACÉRATION OBTENUS

	I	II	III	IV
Acidité	2,9	0,95	1,05	2,5
Matières fixes	4,360	2,840	2,800	2,47
Cendres 0/0	0,479	0,224	0,230	0,375
T par 10 cc.	12	6	6	73
T — 8 —	12	12	6	—
T — 6 —	24	12	12	—
T — 4 —	36	18	12	—
T — 2 —	48	24	18	—

Cette expérience confirme les résultats déjà acquis sur la distribution de la diastase dans le mycélium de divers âges. Elle montre aussi qu'on peut obtenir facilement des solutions de

protéase suffisamment actives, bien que chargées encore de beaucoup de matières inertes.

Pour les en débarrasser le mieux possible, je me suis arrêté à la précipitation par l'alcool.

J'ai réussi par ce moyen à obtenir un produit très actif et dépourvu de matières inertes jusqu'à une certaine limite, qui apparaît alors dans l'expérience. J'ai voulu en même temps me renseigner sur la composition de ce liquide diastasifère.

Expérience II. — On a soumis à la précipitation fractionnée par l'alcool 500 c. c. de liquide de macération filtré, et on a obtenu ainsi les produits de trois précipitations successives, sous forme d'un résidu brun dans la première, presque blanc dans la troisième, et qui était collé sur le papier à filtrer.

On a alors épuisé ces trois filtres séparément avec la même quantité d'eau, et on a examiné de la façon suivante les trois solutions obtenues :

EXAMEN DES SOLUTIONS DES TROIS PRÉCIPITÉS

	I	II	III
Matières fixes 0/0	0gr,763	3gr,213	1gr,730
Cendres —	0,010	0,401	0,160
Réaction xanthoprotéique	faible	sensible	franche
— du biuret	négative	incertaine	franche
— de Fehling direct.	—	négative	négative
— de Fehling après ébullition en prés. d'acide.	positive	pas caractéristique	négative
T pour 10 c. c.	96	3	3
T — 5 —	240	6	3

On voit, par les chiffres ci-dessus, que les dernières portions du précipité par l'alcool contiennent la matière active dans un état relativement plus pur. D'autre part on remarque qu'on ne réussit pas à diminuer la quantité des cendres au delà de 10 0/0 des matières pesées.

Au point de vue de la nature des substances qui constituent ou accompagnent la diastase, j'ai eu des réactions tout à fait franches qui indiquent la présence de la peptone.

La réaction du biuret n'apparaît dans le liquide diastasifère qu'après une purification préalable, mais elle accompagne constamment la diastase.

Ces faits connus, je me suis préparé une provision de protéase constituée par des morceaux de papier à filtre, qui portaient un résidu facilement soluble dans l'eau et donnant des solutions actives : ce sont ces solutions qui ont servi au cours de cette étude.

II

DES INFLUENCES QUI PEUVENT FAIRE VARIER L'ACTIVITÉ D'UNE SOLUTION DE PROTÉASE

Comme on pouvait s'y attendre, ces solutions de protéase, mises à l'abri des microbes au moyen d'antiseptiques, perdent leur pouvoir protéolytique, et d'autant plus vite que la température est plus élevée. Une exposition de quelques heures à 70° leur enlève la faculté de liquéfier la gélatine.

Dans le vide, le pouvoir diastasique baisse presque aussi rapidement qu'en présence de l'air, mais en revanche il se conserve mieux si l'on remplace l'air par CO^2.

Ce fait pouvait tenir à la faible réaction acide qui est conférée au liquide par l'acide carbonique. En effet, il a été facile d'établir qu'en réaction acide le pouvoir protéolytique d'une solution de protéase se conserve mieux. J'ai donc cherché à fixer le degré de réaction acide auquel la destruction de la diastase est minima.

Ce degré optimum pour la conservation de la protéase en solution apparaît quand, dans le liquide diastasifère, tous les phosphates se trouvent à l'état monobasique. En présence d'acide libre d'une part, et de l'autre au fur à mesure que les basicités libres dans les monophosphates sont saturées, la diastase est détruite plus rapidement.

Voici les chiffres qui prouvent le fait avancé.

Expérience III. — Une solution de protéase est portée, avec quelques gouttes d'acide phosphorique, juste à la neutralité indiquée par le méthylorange, qui vire au rouge dans une liqueur quand tous les phosphates sont à l'état monobasique et que la première trace d'acide libre apparait. On distribue ensuite cette solution dans des petits flacons à raison de 15 c. c. chacun, et on établit 7 échantillons.

Le 1er	reçoit	0cc,50	NaOH N/10	et	0cc,50	d'eau
Le 2e	—	0,25	—	—	0,75	—
Le 3e	—	0,10	—	—	0,90	—
Le 4e	—	0,00	—	—	1,00	—
Le 5e	—	0,10	H_3PO_4 N/10		0,90	—
Le 6e	—	0,25	—	—	0,75	—
Le 7e	—	0,50	—	—	0,50	—

Les flacons, bien bouchés après addition de quelques gouttes de chloroforme, sont portés à l'étuve à 40°. Après 24 heures on les retire, et à chaque essai qui avait reçu de l'alcali on ajoute la quantité correspondante d'acide, et inversement de l'alcali à ceux qui avaient reçu de l'acide, enfin avec de

l'eau on porte dans tous les flacons le liquide au volume de 18 c. c. Ainsi tous les essais se trouvent dans les mêmes conditions de réaction et de concentration : on détermine alors le pouvoir protéolytique.

Essai	1	2	3	4	5	6	7
T pour 9cc	—	24	36	18	18	48	48
— 6cc	—	72	36	18	18	48	72
— 3cc	—	102	48	24	36	72	96

Des 7 mélanges, dont le pouvoir protéolytique était originairement le même, c'est le n° 4 qui se montre le plus actif : c'est celui qui a subi l'action de la température de 40° en étant à la réaction neutre au méthylorange.

On voit encore que la réaction alcaline est plus nuisible à la conservation de notre diastase que la réaction acide correspondante.

Ce fait est intéressant : on verra dans la suite que c'est aussi au voisinage de la réaction acide des monophosphates que la diastase est plus active. Et il est vraisemblable que ces deux phénomènes sont liés d'un rapport étroit.

III

ÉTUDE SPÉCIALE DE L'ACTION DE LA PROTÉASE

J'ai étudié l'action de la protéase sur les trois substances protéiques principales : la gélatine, les albumines, la caséine. Pour chacune d'elles j'ai fait la recherche des produits de la digestion et j'ai déterminé la condition de réaction la plus favorable.

Les essais ont été toujours opérés en double, ils portaient sur des mélanges de ces substances avec la solution de protéase activé dans un cas, et chauffée au préalable dans l'autre.

1° *Action sur la gélatine.* — Jusqu'à présent j'ai presque uniquement pris pour guide dans mes recherches le phénomène de liquéfaction de la gélatine ; le moment est venu de se demander s'il est dû véritablement à un processus de digestion.

Tous les auteurs qui ont étudié l'action des ferments digestifs, des acides ou des alcalis, ou simplement de la chaleur sur les solutions de gélatine, ont observé que celles-ci perdent la propriété de se solidifier ; elles contiennent alors divers produits qui peuvent être différenciés par leur degré de solubilité dans les solutions salines, et qu'on sépare les uns des autres par une saturation fractionnée de la liqueur au moyen de sels neutres.

On est convenu de grouper ces termes successifs en trois types essentiels : proto et deutérogélatose, et peptone.

Dans les solutions de gélatine liquéfiées par action de la protéase, il m'a été facile de séparer l'une après l'autre : la protogélatose, par saturation avec NaCl; la deutérogélatose, qui se précipite dans le liquide débarrassé de la protogélatose, quand on le sature avec du sulfate d'ammoniaque; la peptone enfin, qui reste dissoute dans le liquide saturé à chaud de sulfate d'ammoniaque, et qu'on met en évidence au moyen de la réaction du biuret.

Pour rechercher les produits plus simples que la peptone, j'ai employé la précipitation par l'acide phosphotungstique, et j'ai pu constater que l'action de la protéase amène une augmentation de l'azote non précipitable par ce réactif. On pourrait conclure que l'action de cette diastase ne s'arrête pas à la formation de peptone, mais qu'elle se poursuit jusqu'à des produits de décomposition plus avancée tels que les amides.

Neumeister [1] nie la formation de corps amidés dans la digestion même pancréatique de la gélatine; le même auteur d'ailleurs met en garde [2] contre les résultats fournis par la précipitation au moyen de l'acide phosphotungstique. En effet, en suivant ses indications, j'ai pu vérifier que la peptone de gélatine ne se laisse jamais précipiter complètement ni par l'acide phosphotungstique, ni par les autres réactifs proposés. Dans ces conditions on ne peut tirer aucune conclusion, et je compte revenir sur cette question avec une technique plus sûre.

Mes expériences me permettent pourtant d'affirmer que la liquéfaction de la gélatine par la protéase traduit la transfortion de cet albuminoïde en produits de plus en plus solubles et qui n'ont pas la propriété de gélatiniser.

*
* *

L'action de la protéase sur la gélatine exige une réaction faiblement acide, elle est arrêtée par la réaction alcaline. Or les acides et les alcalis sont à eux seuls capables de liquéfier la gélatine. Dans les expériences précédentes, l'action de l'acidité

1. Neumeister. *Lehrbuch der physiol. Chemie*, I Eh., p. 204.
2. Neumeister. *Zeitschr. f. Biologie*, N. F. Bd. VIII, p. 340.

seule était négligeable, mais à présent je devais établir par des essais plus délicats quelle est, dans la digestion de la gélatine, la part due à l'action de l'acide et celle due à l'action diastasique.

Je n'ai pas limité l'examen au phénomène de liquéfaction, mais j'ai procédé à la détermination quantitative de la gélatine digérée. Dans ce but j'ai employé la méthode de Beckmann[1], qui consiste à insolubiliser les albuminoïdes non digérés en portant à sec le liquide qui les contient après avoir ajouté de l'aldéhyde formique; on les sépare ainsi des produits de la digestion.

J'ai vu d'abord que l'aldéhyde insolubilise non seulement les albuminoïdes inaltérés, mais aussi les premiers termes de la digestion, jusqu'à la protoalbumose. Toutefois cette action s'arrête toujours au même point, et n'est pas sensiblement influencée par des faibles variations dans la réaction du liquide. L'emploi de la formaldéhyde présente encore l'avantage d'arrêter l'action diastasique, et je m'en suis servi de la façon suivante :

Le mélange à essayer, d'un volume de 25 c. c. au plus, et contenant entre 0,5 et 0,2 de gélatine, est neutralisé s'il le faut, et additionné de 2 c. c. de solution de formaldéhyde à 40 0/0. Le tout est alors laissé 8 à 10 heures dans une étuve à 105°. On épuise ensuite le résidu sec à l'eau bouillante à plusieurs reprises, en laissant macérer un certain temps, et on filtre à travers du papier Berzélius. On emploie en tout 500 c. c. d'eau. Les produits insolubilisés forment des pellicules, qui gonflent dans l'eau bouillante sans se dissoudre, et qui restent en partie collées au fond du petit ballon, et en partie tombent sur le filtre. Quand les lavages sont finis, on remet dans le ballon tous les produits insolubilisés en y introduisant le filtre, et le tout sert au dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl.

Pour étudier l'action sur la gélatine de la diastase à des différents degrés d'acidité, et parallèlement celle de l'acidité seule, j'ai opéré de la façon suivante :

Expérience I. — On a distribué dans des petits ballons de Bohème, par fractions de 25 c. c., une solution de gélatine à 2,5 0/0 additionnée de 0,2 0/0 de thymol. Dans une série de ces ballons, on a mélangé des quantités égales de diastase active, et dans une autre série de la même solution chauffée au préalable pendant un quart d'heure à 100°.

Ensuite on a ajouté parallèlement dans les deux séries des proportions croissantes d'acide oxalique, et amené tous les essais au même volume avec de l'eau distillée.

Les mélanges ainsi préparés ont été portés à l'étuve à 35°, et après diges-

1. Beckmann, *Zeitschrift f. analyt. Chemie*, XXXVI, Bd., p.727.

tion on les a retirés pour doser l'azote de la gélatine non digérée, selon la méthode décrite.

Le tableau suivant renferme les proportions employées pour composer les mélanges et les résultats obtenus après la digestion :

Acide ajouté sur 25 c.c. de solution de gélatine en c.c. Ac. Oxalique N.		GÉLATINE NON DIGÉRÉE, EN MILLIGRAMMES D'AZOTE			
		I. Digestion. Durée 12 heures.		II. Digestion. Durée 48 heures.	
		Protéase active	Protéase chauffée	Protéase active	Protéase chauffée
1.	$0^{cc},0$	35,0	63,0	0,0	56,0
2.	1,0	43,4	62,3	0,0	49,0
3.	2,5	58,8	62,3	6,2	45,5
4.	5,0	62,3	62,3	17,6	44,1
5.	10,0	63,0	62,3	25,2	44,8
6.	20,0	63,0	62,3	21,0	19,6
7.	25,0	62,3	60,2	15,4	6,1

Les chiffres ci-dessus nous apprennent que l'action de la diastase et celle de l'acidité dans la digestion de la gélatine se superposent. En même temps des doses croissantes d'acide gênent l'action de la diastase. La contradiction n'est qu'apparente. En effet, dans l'expérience que nous venons d'exposer, on peut bien dégager l'action de la diastase de celle de l'acidité seule. On voit, dans la série où la diastase agit en présence de doses croissantes d'acide, que l'activité de la digestion diminue d'abord et après augmente de nouveau. Dans la série où, toutes choses égales d'ailleurs, la diastase a été rendue inactive, la digestion augmente d'intensité avec la quantité d'acide. Les deux courbes doivent se rencontrer et marcher ensemble ; à partir de ce moment évidemment la diastase ne doit plus entrer en jeu, et dans les deux séries c'est seulement l'acidité qui agit.

Il restait encore à rechercher quelle est la réaction optima pour l'activité de notre diastase.

Dans l'expérience précédente, on a indiqué seulement la quantité d'acide oxalique ajoutée ; or les conditions de réaction d'un liquide pareil dépendent non seulement de la quantité d'acide ajoutée, mais encore plus de la teneur et de la qualité des phosphates présents. On sait qu'on ne doit pas s'éloigner de la neutralité pour rechercher la réaction optima, et dans ces conditions on est censé avoir affaire à des phosphates acides plutôt qu'à de l'acide libre. — On peut tirer profit dans ce cas de l'emploi des différents indicateurs pour composer des mélanges

dont les réactions sont échelonnées, de l'alcalinité par une trace d'alcali libre à l'acidité par acide libre, en passant à travers tous les états des phosphates.

Expérience II. — On a préparé deux mélanges en tout comparables de gélatine à 5 0/0 thymolisée, avec une solution de protéase, active dans un cas, et chauffée au préalable dans l'autre. Ces deux mélanges sont portés juste à la neutralité au méthylorange au moyen de quelques gouttes d'acide phosphorique. On les distribue ensuite dans des flacons à raison de 100 c. c. chacun, et on en fait deux séries d'essais auxquels on ajoute les quantités d'acide et d'alcali indiquées plus bas. Après un séjour de 24 heures à la température de 35°, on a retiré de chaque flacon des portions de 10 c. c. qui, après avoir été neutralisées, ont servi au dosage de l'azote de la gélatine non digérée.

Les mélanges ont reçu :

			Azote de la gélatine non digérée	
	H_3PO_4 N	H_2O	par la protéase active	par la protéase chauffée
	—	—	—	—
1.	6cc,0	4cc,0	67mgr,2	63mgr,7
2.	4,0	4,0	44,8	67,2
3.	2,0	8,0	42,0	70,7
4.	0,0	10,0	39,2	71,4
	NaOH N			
5.	2,0	8,0	51,1	74,2
6.	4,0	5,0	73,5	72,8
7.	6,0	4,0	72,8	63,0
8.	8,0	2,0	21,0	20,3
9.	10,0	0.0	00,0	00,0

On voit d'une façon vraiment évidente que le maximum d'activité de la diastase a lieu dans le mélange n° 4 qui est justement celui où la réaction est restée à la neutralité du méthylorange, qui ne contient donc pas d'acide libre : on sait au contraire qu'il contient des phosphates monobasiques. Une nouvelle quantité d'acide ajoutée à la liqueur reste à l'état libre et gène l'action de la diastase, qui d'autre part est arrêtée bien vite quand on sature par la soude les basicités libres des monophosphates.

2° *Action sur les albumines.* — La digestion des albumines par le mélange de diastases de l'*Aspergillus niger* est moins facilement saisissable que celle de la gélatine.

L'albumine coagulée par la chaleur, quelle qu'elle soit, n'est jamais dissoute. Même en agissant avec des solutions très acti-

ves sur la gélatine. on ne voit attaquer ni l'albumine d'œuf des tubes de Mette, ni la fibrine cuite.

L'albumine d'œuf en solution est aussi très résistante. Les différences relevées entre deux liquides, également acides ou alcalins, additionnés les uns de protéase, les autres de la même protéase chauffée à 100°. ne présentent que des différences peu appréciables qu'il serait trop long de décrire, je reviendrai du reste sur ce point dans un des chapitres suivants.

Je veux cependant attirer l'attention sur les phénomènes de coagulation, qui ont lieu dans les mélanges albuminoïdes sans l'intervention de la diastase. L'albumine dont la réaction est voisine de la neutralité au tournesol se coagule toujours, rapidement si l'on chauffe, plus lentement mais aussi bien à la température ordinaire. Elle se transforme ainsi en un produit qui n'est dissous que par des solutions concentrées d'acide ou d'alcali, ou mieux par l'action de la pepsine, mais jamais par la diastase de l'*Aspergillus*.

Bien plus sensible est l'action digestive sur la fibrine. Il faut cependant se mettre dans des conditions favorables, qui consistent surtout dans la nécessité d'opérer avec des solutions de diastase très active et en même temps pas trop dense. La présence des matières inertes qui accompagnent la diastase en empêche l'action. J'ai évité cette difficulté en opérant de la façon suivante.

A deux volumes égaux de la même solution de protéase, dont l'une avait été chauffée à 100° au préalable, on ajoute des flocons de fibrine de porc fraîche essorée; on laisse en contact pendant quelques heures à une température inférieure à 10° en agitant de temps en temps, et ensuite on retire la fibrine, on l'exprime et on distribue les flocons dans des vases qui contiennent de l'eau distillée chloroformée, ou des solutions N/100, N/50, N/25 d'acide phosphorique ou de soude caustique. Après quelques heures de séjour à l'étuve à 45°, on voit déjà complètement dissoute la fibrine qui avait été en contact avec la solution diastasique active et plongée ensuite dans la solution N/100 acide; dans l'essai témoin la fibrine était simplement gonflée. A la neutralité la fibrine s'émiette sans jamais se dissoudre complètement : dans la solution alcaline N/100 il n'y a pas de différence entre l'essai et son témoin. Avec le temps et en présence de doses plus considérables d'acide et d'alcali, la dissolution de la fibrine se fait partout, sauf à la neutralité, et, pour révéler les différences dues à l'action de la diastase, j'ai eu recours à des réactions comme celles par l'acide nitrique, ou par précipitation avec les sels neutres.

Mais l'étude de l'action d'une diastase digestive relativement faible, et qui agit surtout au voisinage de la neutralité, n'est pas aisée à poursuivre sur la fibrine, car cette substance subit une digestion spontanée, qui est probablement due à des diastases qu'elle emporte du sang, et dont les effets couvrent ceux de l'action à étudier. J'ai mieux réussi en m'adressant à l'albumine du sérum sanguin.

Voici dans quelles conditions j'ai mis en évidence la digestion et les conditions de réaction optima :

On a préparé des mélanges de sérum de sang de bœuf dilué au dixième, et chauffé pour détruire les diastases qu'il contient déjà, avec des solutions de diastase chauffée dans un cas et active dans l'autre. On a disposé deux séries parallèles d'essais dont les termes possédaient des réactions qui s'échelonnaient de l'alcalinité à la phénolphtaléine à l'acidité au méthylorange.

De ces mélanges, on prélevait, aussitôt après la préparation, des essais sur lesquels on dosait l'albumine coagulable. D'autres essais étaient prélevés après un séjour de 48 heures à 45°. Dans le tableau suivant sont rangés les chiffres qui représentent en miligrammes d'azote l'albumine insolubilisable avant et après digestion. Chaque essai porte à côté l'indication de la réaction.

	Mélanges avec la diastase			
	chauffée		active	
Réaction	avant	après	avant	après
—	—	—	—	—
1. Acide au méthylorange	85mgr,4	76mgr,3	84mgr,7	49mgr,0
2. Neutre —	85,4	79,1	83,3	39,2
3. Acide au tournesol	85,1	74,2	85,4	63,5
4. Neutre —	86,1	70,0	85,4	78,8
5. Alcalin —	84,7	82,6	84,0	70,7
6. Neutre à la phénolphtaléine	84,7	61,4	84,7	78,4
7. Alcalin —	84,0	68,5	84,7	68,6

Il résulte de cette expérience que l'activité de la protéase sur l'albumine du sérum est bien manifeste, et qu'elle est bien plus prononcée à la réaction des phosphates acides. Le n° 4 seul présentait une coagulation, qui était égale dans l'essai et dans le témoin, et dans ces conditions, l'action de la diastase était nulle. Je reviendrai dans le chapitre suivant sur les différences entre l'action de la protéase sur l'albumine d'œuf et sur celle du sérum ; à présent je dirai seulement que cette dernière paraît plus facilement transformable en alcali-albumine ou acide-albumine sans donner lieu à coagulation, et que c'est jus-

lement sur cette transformation de l'albumine que l'action de notre diastase paraît se porter.

Dans les mélanges n° 3, où la digestion par la protéase avait été plus active, j'ai recherché comparativement les produits formés : j'y ai trouvé, en suivant la marche indiquée dans l'étude de la gélatine, les produits successifs de la dégradation de l'albumine jusqu'à la peptone. Cependant j'ai toujours remarqué que la quantité des produits premiers de la digestion, tels que les albumoses et la peptone, était toujours très petite vis-à-vis de l'albumine disparue.

Il est probable que la diastase de l'aspergillus pousse de suite la digestion de l'albumine aux produits plus simples que la peptone, que je n'ai pas encore recherchés ;

3° *Action sur la caséine.* — Si l'on ajoute à du lait normal une solution de protéase bien active, et si l'on porte le mélange additionné d'un antiseptique à l'étuve à 45°, on voit bientôt se former un coagulum qui se contracte lentement sans former dépôt au fond du vase, et qui n'est pas dû à un changement dans la réaction. Il y a donc de la présure dans la préparation diastasique. Ensuite ce coagulum diminue de plus en plus de volume, il semble se redissoudre, mais il ne disparaît jamais complètement, même après un très long temps. Le liquide devient jaune miel, et donne les réactions des albumoses et de la peptone

L'action de la protéase sur le lait ressemble donc en tout à celle de la caséase étudiée par M. Duclaux.

Afin d'éviter la complexité due à la superposition de la coagulation par la présure et de la digestion par la diastase protéolytique, j'ai essayé la digestion des solutions artificielles de caséine.

Expérience I. — Une solution à 3 0/0 de caséine dans l'eau de chaux, neutralisée et additionnée de protéase, est portée à l'étuve à 35°.

On voit après quelques heures la masse du liquide opaque, mais homogène, se troubler davantage, et se séparer ensuite en deux portions ; une couche inférieure formée par un dépôt floconneux, et le liquide qui surnage, qui devient de plus en plus transparent.

Le dépôt, d'aspect floconneux d'abord, devient pulvérulent plus tard et, par les réactions qu'il donne, paraît correspondre à celui qui a été observé dans la digestion de la caséine au moyen du suc gastrique, et que l'on considère comme constitué par des nucléines non digestibles.

Le liquide se colore de plus de plus, et, dans les prélèvements faits après une digestion de quelques jours, il donne les réactions des albumines et de la peptone, tandis que, dans une digestion prolongée pendant un mois, le liquide séparé du résidu insoluble ne montre plus que la réaction xanthoprotéique. J'ai opéré une précipitation fractionnée par l'alcool des substances dissoutes dans ce liquide, afin de voir si les substances albuminoïdes étaient vraiment disparues, ou si les réactions qui les décèlent étaient seulement empêchées. Mais aucune des portions obtenues ne donnait la réaction du biuret.

Il paraît donc que la digestion ne s'arrête pas à la formation de peptone.

Je me suis alors appliqué à établir les conditions de réaction les plus favorables à la digestion de la caséine par la protéase. Et dans ce but j'ai opéré d'après les mêmes règles que dans les expériences précédentes.

Expérience II. — Chaque essai contenait 25 c. c. d'une solution de caséine à 2,5 0/0 dans l'eau de chaux, et qui avait été rendue neutre a la phénolphtaléine. On y avait ajouté 5 c. c. de liquide diastasifère, et des quantités croissantes d'acide phosphorique jusqu'à dépasser de peu le moment de la précipitation de la caséine. C'est au n° 7 que la précipitation commence.

Tous les essais sont ramenés au même volume avec de l'eau distillée.

Après une digestion de 48 heures à l'étuve à 35°, on a acidifié également tous les essais, qui étaient contenus dans des ballons de Bohême, et on a ajouté 2,0 c. c. de solution de formaldéhyde pour procéder au dosage de l'azote dans le résidu non digéré.

	Acide phosph. N. ajouté	Azote insolubilisable après digestion en présence de diastase	
		active	chauffée à 100°
	—	—	—
Nos 1.	0cc,00	52mgr,5	88mgr,2
2.	0,10	51,8	88,2
3.	0,25	54,6	88,9
4.	0,50	51,1	87,5
5.	1,00	39,2	87,5
6.	1,50	30,1	86,8
7.	2,00	26,6	78,4
8.	2,50	35,0	88,2
9.	3,00	39,8	88,2

Expérience III. — Cette deuxième expérience a été conduite dans les mêmes conditions que la précédente, seulement on s'est servi d'une solution de caséine dans l'ammoniaque, et les doses d'acide phosphorique nécessaires à amener la précipitation ont été un peu plus grandes. C'est aussi l'essai n° 7 qui se trouve à la limite du commencement de précipitation.

	Acide phosph. N. ajouté	Azote insolubilisable après digestion en présence de diastase active	chauffée à 100°
	—	—	—
Nos 1.	0cc,00	47mgr,6	56mgr,5
2.	0,10	53,9	78,4
3.	0,25	46,9	80,5
4.	0,50	39,2	91,0
5.	1,00	30,8	83,3
6.	2,00	28,0	63,0
7.	3,00	21,7	63,0
8.	4,00	25,2	63,0
9.	5,00	32,9	58,8

De ces chiffres on peut conclure que la digestion de la caséine par la protéase est bien active : elle est favorisée par une faible réaction acide. Le maximum d'action se place au maximum d'acidité qu'une solution de caséine peut atteindre avant de commencer à précipiter.

IV

ÉTUDES COMPARATIVES DE LA PROTÉASE AVEC D'AUTRES DIASTASES PROTÉOLYTIQUES

Après l'étude spéciale que je viens d'exposer, les caractères principaux de la protéase sont suffisamment établis pour en déduire les relations de parenté et les dissemblances qui existent entre celle-ci et les autres diastases digestives des albuminoïdes. Cependant, pour assigner à la diastase en question une place déterminée parmi les autres, j'ai trouvé nécessaire de poursuivre des recherches comparatives portant à la fois sur l'action de la protéase et sur celle de la pepsine, de la pancréatine et de la papaïne, et cela dans des conditions permettant le mieux d'obtenir des résultats suffisamment comparables.

Tout d'abord, il fallait rechercher dans quel sens et dans quelle mesure ces différentes diastases sont influencées par les variations de la réaction du milieu où elles agissent.

Je me suis servi des préparations commerciales de ces trois diastases, et j'en ai étudié l'action comparativement avec mes préparations de protéase. Des digestions de gélatine, de fibrine et de caséine ont été mises en train avec ces quatre diastases, et pour chacune d'elles on a fait plusieurs essais, où, toutes choses étant égales d'ailleurs, la réaction du milieu variait de

l'acidité par acide libre à l'alcalinité par des phosphates tribasiques. Pour obtenir des résultats concluants, il a fallu d'abord connaître le pouvoir protéolytique de chacune des préparations employées, et les limites de réaction entre lesquelles elles sont actives. Il est nécessaire d'opérer avec des quantités de ces diastases, telles que l'action soit ni trop rapide ni trop lente : dans le premier cas l'influence de la réaction est difficile à saisir, dans le deuxième on ne saurait bien définir si les modifications observées sont dues à l'action de la diastase ou à celle de la réaction.

Expérience I. — *Digestion comparée de la gélatine.* — Chaque tube, contenant 5 c. c. de gélatine à 20 0/0 et thymolisée, reçoit 5 c. c. de solutions des différentes diastases, et la dose d'acide ou d'alcali nécessaire pour l'amener à la réaction indiquée plus bas. Tous les tubes sont ensuite ramenés, au moyen d'eau distillée, au même volume, et sont portés à l'étuve à 35°.

Dans le tableau suivant, on a indiqué, dans la case correspondant à chaque essai, le nombre d'heures nécessaires à la liquéfaction de la gélatine.

	Protéase	Pepsine	Pancréatine	Papaïne	Témoins
I. Acide au méthylorange contient 5 cc. H_3PO_4/N libre	36	12	—	—	—
II. — — — 2,5 —	24	6	—	24	—
III. — — — 1,0 —	24	6	72	24	—
IV. Neutre — — des monophosphates	9	6	48	12	—
V. Acide au tournesol contient un mél de mono et biphosphate.	12	24	24	3	—
VI. Neutre — — — — —	48	—	3	3	—
VII. Alcalin — — — — —	—	—	3	12	—
VIII. Neutre à la phénolphtaline contient des biphosphates.	—	—	3	24	—
IX. Alcalin — — triphosphates.	48	48	3	48	48

Expérience II. — *Digestion comparée de la fibrine.* — On place des boulettes de fibrine de porc fraîche essorée et finement hachée, toutes à peu près du poids de 0,5 grammes, dans des éprouvettes larges et basses, et on y verse la même quantité de solution diastasique qu'on avait employée pour la gélatine, et les doses d'acide ou d'alcali indiquées dans le tableau : le volume du mélange est porté dans tous les essais à 50 c. c.

Dans la case correspondante à chaque mélange on a indiqué l'état de la fibrine après un séjour de 5 heures à l'étuve à 35°.

Le n° 1 indique que la fibrine est seulement gonflée, les n°s 2 et 3 qu'elle a subi une dissolution plus ou moins avancée, le signe + indique la dissolution complète, enfin avec le signe — on indique que la fibrine n'a pas changé d'aspect.

	1 Ac. phosph. N c.c. 5,0	2 Ac. phosph. N c.c. 2,5	3 Ac. phosph. N c.c. 1,0	4 Ac. phosph. N c.c. 0,5	5 Rien.	6 Soude N c.c. 0,5	7 Soude N c.c. 1,0	8 Soude N c.c. 2,5	9 Soude N c.c. 5,0
Protéase	3	3	+	+	2	—	1	2	3
Pepsine	+	+	+	+	—	—	1	2	3
Pancréatine	1	1	1	1	3	3	+	+	+
Papaïne	1	1	1	2	3	2	1	2	3
Témoins	1	1	1	—	—	—	2	3	3

Expérience III. — *Digestion comparée de la caséine.* — Des tubes contenant chacun 5 c. c. de lait dégraissé et additionné de 2 0/00 d'acide phénique, reçoivent 5 c. c. de solution diastasique et les doses d'acide ou d'alcali indiquées au tableau, ensuite la quantité d'eau phéniquée nécessaire pour amener le mélange à 15 c. c. Après 12 heures d'étuve à 35°, les tubes sont retirés et agités fortement.

Dans la case correspondante à chaque mélange, on a indiqué par les chiffres 1, 2, 3, le degré de solubilisation de la caséine, comme on peut l'apprécier par la diminution de l'opacité du mélange.

	1 Ac. phosph. N c.c. 5	2 Ac. phosph. N c.c. 2,5	3 Ac. phosph. N c.c. 1,0	4 Ac. phosph. N c.c. 0,5	5 Rien.	6 Soude N c.c. 0,5	7 Soude N c.c. 1,0	8 Soude N c.c. 2,5	9 Soude N c.c. 5,0
Protéase	2	2	2	3	3	2	2	2	3
Pepsine	2	2	1	1	1	0	1	2	3
Pancréatine	1	1	1	2	3	3	3	3	3
Papaïne	0	0	1	1	2	2	1	2	3
Témoins	0	0	0	0	0	0	1	2	3

Les résultats des expériences que je viens d'exposer confirment des points déjà établis, mais qu'il était intéressant de

vérifier en se plaçant dans des conditions parfaitement comparables : il en résulte que :

La protéase agit déjà en milieu neutre, et cela n'arrive pas pour la pepsine, mais bien pour la pancréatine et la papaïne.

La réaction acide est favorable à l'action de la protéase, mais dans une mesure plus limitée que pour la pepsine. La réaction alcaline arrête l'action de la protéase, et plus brusquement que cela n'arrive pour la papaïne.

Si l'on veut tenir compte de l'état des phosphates dans le mélange comme il nous est révélé par les indicateurs, on peut ranger ces quatre diastases dans l'ordre suivant :

La pepsine commence véritablement à agir dans les milieux qui font virer au rouge le méthylorange, et qui contiennent donc de l'acide libre.

La protéase agit le mieux à la réaction acide au tournesol et neutre encore au méthylorange, c'est-à-dire en présence de monophosphates.

La papaïne se comporte comme la protéase, seulement elle paraît plus sensible que la protéase à l'action nuisible de l'acide libre, et d'autre part, elle est moins gênée par la présence des bi-phosphates.

Enfin, la pancréatine agit entre la neutralité au tournesol et la neutralité à la phénolphtaline. Après cette limite, son action est couverte par celle de l'alcali seul.

J'ai vérifié que pour les autres diastases comme pour la protéase, la réaction optima d'action correspondait à celle où la destruction de la diastase en solution est la plus faible. En opérant comme je l'ai exposé ci-dessus pour la protéase, j'ai pu constater que c'est justement aux réactions sus-indiquées : à l'acidité au méthylorange pour la pepsine, à l'acidité au tournesol pour la papaïne, et à la neutralité à la phénolphtaline pour la pancréatine, que ces diastases gardent le mieux leur activité quand on les conserve en solution.

*
* *

Les expériences que je viens d'exposer nous montrent seulement en gros le phénomène de la digestion par ces quatre diastases. Il reste encore à rechercher comparativement les produits de ces digestions.

Dans ce but, et pour vérifier en même temps les résul-

tats des expériences précédentes, j'ai opéré sur des solutions de gélatine et d'albumine du sérum sanguin chauffé. J'ai préparé comme précédemment des mélanges de ces deux substances albuminoïdes et des solutions diastasiques, et je les ai amenées à des réactions différentes et bien définies, sans rien altérer dans les rapports de volume et de concentration.

De ces mélanges, on a prélevé des portions égales, une fois avant la digestion et une autre après un séjour de 24 heures à l'étuve à 45°. Sur ces portions on a dosé la quantité de gélatine et d'albumine non digérée par les méthodes déjà décrites. Les chiffres de l'azote qui suivent indiquent en milligrammes la quantité d'azote du résidu *insoluble* sur 100 c. c. de mélange, et permettent d'apprécier l'action de chaque diastase suivant les différentes réactions du milieu.

DIGESTION DE LA GÉLATINE PAR LA					
Azote dans le résidu insoluble avant.	Protéase. 0gr,3553	Pepsine. 0gr,3528	Pancréatine 0gr,3288	Papaïne. 0gr,3524	Témoins. 0gr,3280
Après la digestion.					
1. Acide au méthylorange.	134mgr,3	228mgr,5	280mgr,0	282mgr,4	292mgr,2
2. — au tournesol.	0,0	248,5	281,9	147,0	288,7
3. Neutre —	0,0	304,0	252,5	28,0	258,3
4. Alcalin —	322,5	304,4	0,0	251,9	305,5
5. — à la phénolphtaline.	281,5	288,7	0,0	281,4	262,9

DIGESTION DE L'ALBUMINE PAR LA					
Azote dans le résidu insoluble avant.	Protéase. 0gr,3211	Pepsine. 0gr,3250	Pancréatine 0gr,3195	Papaïne. 0gr,3200	Témoins. 0gr,3010
Après la digestion.					
1. Acide au méthylorange.	212mgr,8	14,1	310mgr,0	301mgr,5	305mgr,9
2. — au tournesol.	186,1	121,8	305,5	311,5	312,9
3. Neutre. —	147,7	292,5	252,0	242,5	297,5
4. Alcalin. —	275,0	308,0	129,5	212,5	277,5
5. — à la phénolphtaline.	35,0	38,2	74,2	85,1	35,0

Les conclusions déjà arrêtées se trouvent suffisamment confirmées par ces nouveaux résultats, qui sont plus précis sans être plus significatifs. En effet, l'intensité de la digestion ne peut pas être exprimée seulement par la disparition de la substance albuminoïde primitive, mais par le travail moléculaire accompli, qui dépend aussi de la nature des produits formés. J'ai alors repris ces mélanges après quelques semaines (pendant ce temps la digestion s'était achevée) pour les soumettre à une analyse systématique dans le but de rechercher les produits de la digestion jusqu'à la peptone. Pour cela j'ai suivi constamment la même marche et j'ai opéré sur des quantités égales et dans les mêmes conditions, afin de pouvoir comparer les résultats.

J'ai pu ainsi constater que le processus de dégradation de la molécule albuminoïde jusqu'à la peptone suit la même marche, quelle que soit la diastase ou même l'agent chimique, acide ou alcali, qui la détermine. Les différences consistent essentiellement non dans la qualité, mais dans les proportions des divers produits formés ; j'ai toujours observé que l'acte de la digestion se révèle par des changements dans les caractères de solubilité de la matière albuminoïde. L'albumine subit d'abord des transformations qui ne paraissent pas réclamer l'intervention de la diastase. Si la réaction est près de la neutralité au tournesol, il y a une coagulation. Si la réaction est acide ou alcaline, l'albumine reste en solution, mais elle est transformée en produits insolubles dans les milieux neutres, et qui par conséquent précipitent par addition respectivement d'alcali ou d'acide.

L'action de la diastase entre en jeu pour former des produits de plus en plus solubles, et par suite plus difficilement précipitables par la saturation au moyen de sels neutres.

L'influence de la réaction se manifeste dès les premiers changements subis par la matière albuminoïde, et je pense qu'elle doit surtout déterminer l'action ultérieure qui se porte sur la peptone. Il serait intéressant de reprendre ces expériences pour étudier les produits plus simples que la peptone.

* * *

Après avoir comparé la protéase avec les autres diastases.

en rapport d'abord avec la réaction du milieu, ensuite avec les produits de leur digestion, il restait encore à étudier leur activité en rapport avec les diverses substances albuminoïdes.

Ce problème a été posé par Duclaux, qui est arrivé à se demander si chaque matière albuminoïde n'a pas sa diastase spécifique, tout au moins dans les limites où cela se vérifie pour les diastases des hydrates de carbone.

J'ai voulu étudier un côté de cette question bien complexe, celui qui consiste à comparer l'activité des quatre diastases sur les différentes substances albuminoïdes. Je me suis donc proposé de rechercher s'il y a, ou non, proportionnalité dans l'activité de ces préparations diastasiques vis-à-vis des différentes substances. Déjà au cours des expériences dont il a été question, et dans lesquelles j'avais fait agir dans le même temps et dans des conditions comparables la même quantité de chacune de ces diastases sur des échantillons égaux des différentes substances, j'avais pu remarquer que le pouvoir digestif des préparations employées n'était ni constant ni proportionnel, quand on les faisait agir sur des albuminoïdes différents.

Je me suis alors appliqué à préparer des solutions possédant au même degré le pouvoir de liquéfier la gélatine, pour les faire agir ensuite comparativement sur la fibrine. J'ai pu ainsi constater que la pepsine digère relativement mieux les albumines que la gélatine. Tandis qu'une solution de pepsine faiblement active sur la gélatine digère aussi très bien la fibrine et l'albumine cuite, j'ai pu avoir des solutions de pancréatine, de papaïne, et de protéase, encore capables de liquéfier la gélatine. mais inactives sur la fibrine.

C'étaient là les résultats d'une première série d'expériences, dont je négligerai de donner les détails. Mais bientôt j'eus à me préoccuper d'une cause d'erreur très grave : celle de l'influence des substances dissoutes dans les liquides employés.

Dans une expérience ou je faisais agir des quantités décroissantes de diastases sur des quantités égales de fibrine, les essais étant portés au même volume avec de l'eau distillée, j'ai vu le maximum d'action se placer, non pas là où il y avait plus de diastase, mais dans les derniers termes de la série, où la quantité de diastase était plus petite et le milieu moins concentré. Dans ce cas l'observation portait sur une solution de

protéase, qui contenait $2^{gr},5$ 0/0 de matières fixes. Des essais parallèles, qui avaient reçu une solution de pepsine, ne montraient pas ce phénomène.

Les liquides diastasifères, qui étaient préparés de façon à avoir le même pouvoir liquéfiant sur la gélatine, n'avaient pas le même pouvoir dissolvant sur la fibrine : mais cela pouvait tenir, non pas à une différence spécifique des diastases, mais bien à la différence qualitative et quantitative des substances inertes dissoutes dans ces liquides.

Il apparaît donc nécessaire d'opérer avec des liquides diastasifères de même composition. Et dès lors les essais ont été répétés chaque fois en même temps avec la protéase et l'autre diastase à comparer avec elle. On procédait de la façon suivante.

On préparait des solutions des deux diastases, qui étaient douées du même pouvoir liquéfiant vis-à-vis de la gélatine. Ces solutions étaient partagées en deux portions, l'une était gardée telle quelle, l'autre chauffée à 70° pendant 2 heures. Ensuite on mélangeait à volumes égaux la solution de protéase active et et celle de l'autre chauffée, et inversement.

De ces deux liqnides, qui ne différaient que par par leur principe actif, on portait des quantités décroissantes sur des échantillons de gélatine et de fibrine : les dilutions étaient faites en ajoutant, au lieu d'eau distillée, un mélange en parties égales de ces deux solutions chauffées.

Je pense qu'il n'est pas possible d'approcher d'avantage de l'identité des conditions.

Il fallait encore tenir compte d'un coefficient de premier ordre, l'influence de la réaction Cette influence est probablement différente pour la même diastase vis-à-vis des diverses substances. Et j'ai comparé la protéase et la pepsine à différents degrés d'acidité, en commençant par la neutralité au méthylorange ; mais, pour la comparaison avec la pancréatine et la papaïne, il fallait se borner à la réaction neutre au tournesol. Je ne me suis pas contenté de l'observation directe de la dissolution de la fibrine, mais j'ai recherché, par le chauffage en présence d'acide nitrique, le moment de la disparition complète de l'albumine coagulable.

Expérience. — On a préparé :

a) 200 c. c. solution de protéase contenant 2,5 0/0 matières fixes.

b) 200 c. c. solution pepsine contenant 4,7 0/0 matières fixes.

Ce sont là les proportions nécessaires pour obtenir des solutions dont l'action sur la gélatine soit comparable. De chacune de ces solutions, on garde 50 c. c. et l'on chauffe les 150 c. c. restants. Ensuite, on fait les mélanges suivants :

pr) 50 c. c. solution protéase active + 50 c. c. solution pepsine chauffée.

ps) 50 c. c. solution pepsine active + 50 c. c. solution protéase chauffée.

pp) 100 c. c. solution protéase chauffée + 100 c. c. solution pepsine chauffée.

Les deux mélanges actifs *pr* et *ps* sont distribués en quantités décroissantes dans des tubes de gélatine au thymol et dans des vases contenant des boulettes de fibrine. On se sert du mélange inactif *pp*, pour amener dans tous les essais les liquides au même volume. On s'est arrangé de façon à avoir trois séries d'essais, dont la première à la réaction neutre au méthylorange, la deuxième en présence d'acide phosphorique libre au titre N/100, et la troisième au titre N/50.

DIGESTION DE LA GÉLATINE

	Protéase			Pepsine		
	I	II	III	I	II	III
Le mélange est liquide par 10cc après heures	24	36	36	72	60	48
— 8 — —	48	48	48	—	66	48
— 6 — —	48	60	60	—	72	48
— 4 — —	66	66	66	—	84	66
— 2 — —	72	72	72	—	90	66

DIGESTION DE LA FIBRINE

Observation après 12 heures à l'étuve à 35°.

Bien que l'on puisse remarquer une graduation dans l'effet produit par des quantités décroissantes de diastase, les différences ne sont pas assez distinctes pour les représenter avec des chiffres.

Par la protéase
- Ie série. — La fibrine est émiettée.
- IIe — La fibrine est dissoute et le liquide précipite faiblement par HNO_3 à chaud.
- IIIe — La fibrine est dissoute et le liquide précipite abondamment par l'HNO_3 à chaud.

Par la pepsine
- Ie série. — La fibrine est intacte.
- IIe — La fibrine est dissoute et le liquide ne précipite pas par HNO_3.
- IIIe — La fibrine est dissoute et le liquide ne précipite pas par HNO_3.

Cette expérience montre que la solution de protéase, comparativement à celle de pepsine, est plus active sur la gélatine que sur la fibrine. — Maintenant qu'on a rendu les deux liquides diastasifères parfaitement comparables, la différence d'action,

quoique moins prononcée, apparaît bien saisissable, et on ne peut pas l'attribuer à des influences secondaires.

La comparaison de la protéase avec la pancréatine et la papaïne a été faite à la neutralité au tournesol; elle n'est pas aisée, car dans ces conditions la fibrine s'émiette sans se gonfler, et ne se dissout jamais complètement. — En tout cas j'ai pu constater toujours que la diastase qui se montrait la plus active sur la gélatine, attaquait aussi plus vite la fibrine.

J'ai répété ces expériences avec l'albumine du sérum, et dans ce cas on peut évaluer l'activité de chaque mélange par la rapidité avec laquelle une coagulation a lieu dans le liquide albuminoïde. Dans ces conditions les résultats précédents étaient confirmés.

* * *

De ces dernières expériences, où on a fait agir les quatre diastases sur deux albuminoïdes choisis parmi les plus différents, on a pu, seulement dans le cas de la comparaison de la protéase avec la pepsine, saisir une disproportion entre la digestion de la gélatine et celle de la fibrine. Mais c'est en opérant sur l'albumine d'œuf coagulée ou même en solution, qu'une différence bien accusée apparaît entre l'action de la protéase et de la papaïne d'une part, et de la pepsine et de la pancréatine de l'autre.

Expérience. — On a fait agir des solutions des quatre diastases, préparées de façon à avoir le même pouvoir protéolytique vis-à-vis de la gélatine, sur des échantillons d'émulsion d'albumine coagulée. Cette méthode, employée par M. Effront, révèle des actions digestives très faibles : elle est même plus sensible que celle des tubes de Mette.

Après quelques heures de séjour à l'étuve à 40°, on voit les échantillons contenant la pepsine en présence d'acide libre devenus parfaitement limpides. Il faut un temps un peu plus long, mais cette dissolution a lieu aussi avec la pancréatine à la réaction neutre à la phénolphtaline.

Au contraire il n'y avait pas d'action du tout, même après un long temps, quelle que soit la réaction, dans aucun des échantillons, qui avaient reçu de la *protéase* ou de la *papaïne*.

C'est là vraiment un caractère différentiel bien tranché entre les diastases digestives de l'organisme animal et les deux d'origine végétale que j'ai examinées. Ces dernières n'ont pas la faculté de dissoudre l'albumine coagulée.

J'ai pu m'assurer que cette différence n'est pas due à la

présence de substances inertes, ni à d'autres influences secondaires. Il restait seulement à rechercher si cela n'était pas une conséquence de la différente sensibilité de ces diastases à l'influence de la réaction du milieu.

En effet il est déjà bien démontré que l'action diastasique est fonction de la réaction.

Elle n'apparaît qu'entre des limites bien déterminées. Or, il est encore possible d'admettre que chaque substance, pour être digérée, doit se trouver dans des conditions spéciales de réaction.

S'il en est ainsi, une diastase peut agir sur une substance, à la seule condition que les limites entre lesquelles la diastase est active, correspondent à celles entre lesquelles la substance est attaquée.

Dans notre cas, on peut penser que la digestion de la gélatine, de la fibrine, des albuminates du sérum sanguin, et de la caséine peut se faire déjà au voisinage de la neutralité.

Au contraire, l'albumine d'œuf coagulée ne peut être dissoute que dans des milieux franchement acides ou alcalins.

Alors, la protéase et la papaïne, qui ont leur maximum d'activité à des réactions comprises entre l'acidité au tournesol et celle au méthylorange, peuvent bien digérer les albuminoïdes mentionnés d'abord, tandis que, en agissant sur l'albumine coagulée, ou bien la réaction est neutre et celle-ci n'est pas attaquable, ou la réaction est appropriée à la substance, et la diastase devient inactive.

Dans le cours de ces expériences, je croyais avoir eu des indications dans ce sens, et j'ai voulu établir une expérience pour démontrer l'exactitude de cette hypothèse. Il fallait, en somme, opérer avec une solution fortement active d'une de ces diastases, et voir si en poussant la réaction on ne pouvait pas obtenir la digestion de l'albumine.

Expérience. — Ayant déjà épuisé la provision de protéase, j'ai dû me contenter de comparer dans ce cas la pepsine avec la papaïne : celle-ci au point de vue de cette expérience pouvait bien remplacer la protéase.

Digestion de la gélatine. — Pour exprimer l'intensité de la digestion, nous avons indiqué la température à laquelle chaque mélange est solidifiable. Il a été nécessaire de modifier ainsi la méthode, puisqu'en employant des solutions très actives la liquéfaction se faisait trop rapidement. Naturellement

la digestion est plus intense dans les essais qui se solidifient à une température plus basse.

Le signe — indique que le mélange ne se solidifiait même pas à 0°. On a indiqué la réaction par le titre correspondant à la quantité d'acide qui est entré dans la composition des mélanges.

Par la pepsine	Neutre.	Acide N/20.	Acide N/10.	Acide N/2.	Acide N.
Le mélange avec 10cc est solide à	18°	10°	0°	5°	5°
« « 8 «	18°	10°	0°	5°	5°
« « 6 «	18°	10°	5°	10°	15°
« « 4 «	18°	15°	5°	15°	15°
« « 2 «	18°	18°	10°	18°	18°
Par la papaïne :					
Le mélange avec 10cc est solide à	—	—	—	5°	5°
« « 8 «	—	—	—	5°	5°
« « 6 «	—	—	0°	10°	10°
« « 4 «	—	0°	0°	15°	15°
« « 2 «	—	0°	5°	18°	18°

Digestion de l'albumine d'œuf en solution á 1 0/0. — La comparaison a été établie sur des parties égales des divers mélanges, additionnées d'un volume de solution saturée de chlorure de sodium et chauffée à 100° dans les mêmes conditions. Avec les chiffres ci-dessous on a indiqué la quantité d'albumine coagulable appréciée à l'œil.

L'albumine coagulable des mélanges avant la digestion, étant comme 10, elle est, après 12 heures, à l'étuve à 45° :

	Par la pepsine.	Par la papaïne.
1° Dans les mélanges à la réaction neutre	comme 10	comme 9
2° — — — acide N/200	— 9	— 9
3° — — — — N/100	— 7	— 9
4° — — — — N/50	— 5	— 9
5° — — — — N/20	— 2	— 9
6° — — — — N/10	— 1	— 9
7° — — — — N/5	— 0	— 9
8° — — — — N/2	— 0	— 9
9° — — — — N	— 0	— 9

Digestion de l'albumine d'œuf coagulée. — Nous nous sommes servi dans ce cas avec avantage de la méthode de Mette.

	Albumine digérée en millimètres.	
1. Par le mélange neutre de pepsine	0mm,	de papaïne 0mm
2. — acide N/200 —	0	— 0
3. — — N/100 —	1,0	— 0
4. — — N/50 —	3,5	— 0
5. — — N/20 —	5,0	— 0
6. — — N/10 —	7,5	— 0
7. — — N/5 —	8,0	— 0
8. — — N/2 —	9,5	— 0
9. — — N —	12,0	— 0

La signification des résultats de cette dernière expérience est tout à fait évidente. Une solution de papaïne, très active sur

la gélatine, ne digère presque pas l'albumine d'œuf en solution, et n'attaque pas du tout l'albumine coagulée, quand, à coté d'elle, dans les mêmes conditions, une solution de pepsine, qui est bien plus faible vis-à-vis de la gélatine, digère l'albumine en solution et dissout l'albumine coagulée d'une façon intense.

On voit qu'il y a bien une différence dans la manière de se comporter des deux diastases vis-à-vis de la réaction, mais l'intervention de l'acidité ne peut pas expliquer tout le phénomène. En effet les solutions de papaïne sont encore très actives sur la gélatine à un degré d'acidité auquel la digestion de l'albumine doit bien être possible. Il faut en conclure que la papaïne et la protéase ne possèdent pas la faculté de décoaguler l'albumine. Cela explique pourquoi elles sont moins actives sur les albumines en général, et complètement inactives sur l'albumine d'œuf.

Il vient naturellement à l'esprit qu'à coté des diastases protéolytiques proprement dites, il existe une diastase décoagulante, qui est présente dans les préparations de pepsine et de pancréatine, et manque dans les deux autres.

J'ai songé dans cet ordre d'idées à rechercher si dans la pepsine on pouvait séparer ces deux actions. Cela ne m'a pas réussi par le chauffage à diverses températures. J'ai vu que c'est à 70° que les deux facultés sont uniformément atteintes. J'avais cru pouvoir les distinguer par l'influence de la réaction qui paraît différente. En effet la présence de doses croissantes d'acide libre gêne davantage l'action de la pepsine sur la gélatine, que celle sur l'albumine.

J'ai eu recours alors à la méthode employée à plusieurs reprises dans le cours de ces expériences, et qui consiste à étudier l'influence de la réaction non pas directement sur l'action de la diastase en présence de ces subtances à digérer, mais sur la diminution de l'activité de la diastase seule en solution. J'ai vu ainsi que la réaction *optima* de conservation est sensiblement la même pour les deux facultés, et on ne peut tabler là-dessus pour attribuer à deux agents différents les deux actions en question.

***

Dans les expériences que je viens d'exposer, l'étude compa-

rative des diastases protéolytiques n'est qu'à peine ébauchée.

Les résultats auxquels on est arrivé sont sûrs, car de nombreux essais les ont confirmés, mais ils ne sont encore ni précis ni complets. Il faut pousser les recherches jusqu'à établir la comparaison sur des individus chimiques bien définis, et il faut aussi la fixer avec des chiffres plus significatifs.

Au point de vue de la technique, je crois pouvoir affirmer que, bien que le pouvoir protéolytique évalué sur la gélatine ne s'applique pas aux autres substances albuminoïdes, ce moyen est précieux pour déterminer les variations dans l'activité de ces diastases, qui n'attaquent pas l'albumine coagulée.

En attendant, les résultats fournis par ces recherches nous ont appris que *la protéase de l'Aspergillus niger a les caractères d'une diastase protéolytique végétale : elle ressemble de près à la papaïne et à la diastase protéolytique du malt. Elle agit sur la gélatine, sur les nucléo-albumines, sur les globulines et sur les albuminates. Sur l'albumine elle n'a pas d'action, sinon après que celle-ci a subi une première transformation : l'albumine d'œuf n'est jamais digérée, et cela probablement à cause de la facilité avec laquelle ses solutions donnent lieu à une coagulation, la protéase n'ayant pas la faculté de dissoudre l'albumine coagulée.*

La place de la protéase parmi les autres diastases protéolytiques est à présent bien déterminée par les caractères qui résultent de l'influence de la réaction.

La réaction la plus favorable est la neutralité au méthylorange, c'est-à-dire l'acidité par des phosphates acides.

On ne peut pas la confondre avec la pepsine, qui agit en présence d'acide libre, et possède en plus le pouvoir dissolvant sur l'albumine coagulée. Elle ne diffère de la papaïne que par une plus grande sensibilité envers l'action nuisible des phosphates alcalins : enfin elle est bien distincte de la pancréatine qui agit en présence de phosphates alcalins et qui n'attaque pas l'albumine coagulée.

* * *

Il résulte de cette étude de la protéase de l'*Aspergillus niger* une notion générale.

Le caractère principal d'une diastase consiste dans sa manière de se comporter vis-à-vis de la réaction du milieu. La

physionomie de chacune d'elles est donnée par le degré de réaction le plus favorable à leur activité.

On a pu voir que cela est vrai pour la résistance de la diastase envers les influences destructrices, qu'il en est de même de son activité sur chaque albuminoïde, et qu'enfin c'est là le seul moyen sûr de les distinguer les unes des autres.

Les connaissances actuelles ne permettent pas de décider s'il existe des diastases spécifiques pour chaque substance albuminoïde, dont les préparations qu'on emploie seraient des mélanges. Seulement ces expériences ont montré que l'action de la même diastase vis-à-vis des différents albuminoïdes n'est pas proportionnelle, et qu'il existe deux actions distinctes, celle de décoagulation de l'albumine, et l'autre de protéolyse.

Je veux enfin attirer l'attention sur la parenté étroite qui existe entre la protéase et la papaïne. Cela peut avoir une signification biologique bien intéressante, si l'on considère que ces deux diastases exercent leur fonction à l'intérieur des cellules, et que leur rôle essentiel doit être dans la désassimilation. La pepsine et la pancréatine opèrent la digestion extra-cellulaire et elles ont des caractères nouveaux.

BIBLIOGRAPHIE

1. WROBLEWSKY. Ueber die chemische Beschaffenheit der Diastase und über das Vorkommen eines Arabans in den Diastase präparaten. — (*Berichte*, 1898, XXX, 2289.)

2. C. C. VAN DER HEIDE, Gelatinöse Lösungen und Verflussigungspunkte der Nahrgelatine. — (*Arch. f. Hygiene*, Bd. 31, p. 83.)

3. F. HOFMEISTER, Ueber die chemische Struktur des Kollagens. (*Zeitschr. f. phys. Chemie*, Bd. 2, 1878, p. 299.)

4. DASTRE ET FLORESCO, Liquéfaction de la gélatine. Digestion saline (*C. R. de la Société de Biologie*, 1895, 10e série, n° 2, p. 671.)

5. NLENCKI, Ueber die Zersetzung der Gelatine und des Eiweisses bei der Faulniss mit Pankreas. (*Berichte*, Bd. 8, 1895, p. 206.)

6. KUHNE, *Lehrbuch der physiologischen Chemie*, 1868, p. 356.

7. CHITTENDEN ET SOLLEY, The primary cleavage products formed in the digestion of gelatin. (*The Journ. of Phisiology*, XII, 1891, p. 23.)

8. KLUG, Ueber die Verdaulichkeit des Leims. (*Pfluger's Archiv.* Bd. 48, 1891, p. 100.)

NEUMEISTER. *Lehrbuch der physiologischen Chemie*, I, Th., 1893, p. 204.

NEUMEISTER. Ueber die Reactionen der Albumosen und Peptone. (*Zeitschrift f. Biologie*, N. F. Bd, p. 340.)

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

Le Gérant : G. MASSON.

14me ANNÉE JUILLET 1900 No 7

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDE DE LA RÉACTION AGGLUTINANTE DU SÉRUM

DANS LES

Infections expérimentales et humaines à pneumocoques.

PAR MM. F. BEZANÇON ET V. GRIFFON

Au cours des infections pneumococciques, le sérum de l'homme et des animaux acquiert la propriété d'agglutiner le pneumocoque[1].

Comme nous l'avons vu, avec M. Widal, dans une première série de recherches[2], le phénomène ne peut être mis en évidence par le *procédé de Widal* pour le sérodiagnostic de la fièvre typhoïde : le pouvoir agglutinatif n'atteint pas, en effet, dans le sérum des malades infectés par le pneumocoque, un degré suffisant pour qu'on puisse le déceler dans le sérum dilué par addition de bouillon. La réaction devient par contre très nette si l'on recourt à une technique différente : *culture du pneumocoque dans le sérum non dilué.*

Nous avons été conduits à l'emploi de cette technique par nos recherches antérieures sur le mode de développement du pneumocoque dans les divers sérums normaux et pathologiques[3]. Cette étude nous avait montré que le pneumocoque se développe facilement dans le sérum normal de l'homme et des animaux de laboratoire, et qu'il s'y présente sous l'aspect de diplocoques encapsulés non réunis en chaînettes ou en amas.

1. BEZANÇON et GRIFFON. *Société de Biologie*, 5 juin 1897; *Presse Médicale*, 17 juillet 1897, page 25; *Congrès Français de Méd. int.*, Montpellier, 1898.
2. BEZANÇON et GRIFFON. *Congrès français de Méd. int.*, Nancy, 6 août 1896.
3. F. BEZANÇON et GRIFFON. *Société de Biologie*, 19 février 1898.

Nous n'avions donc point à craindre, en recourant à la culture directe en sérum, l'inconvénient qui a amené M. Bordet[1] à préconiser l'emploi de sérums dilués pour la recherche du phénomène de l'agglutination, l'agglutination possible de certains microbes, du bacille d'Éberth et du vibrion cholérique en particulier, par le sérum normal.

Nous nous rappelions d'autre part que M. Metchnikoff[2] avait montré en 1891, à une époque où il n'était pas encore question du phénomène de l'agglutination, que le microbe de la pneumonie forme dans le sérum des lapins vaccinés des paquets de streptocoques très longs, et qu'il peut même se produire un dépôt au fond et sur les parois du tube de culture (Mosny[3]).

C'est cette technique de la culture du microbe en sérum non dilué qui nous a permis d'appliquer aux infections à pneumocoque la méthode du sérodiagnostic de Widal, et de vérifier si la réaction agglutinante est bien, dans les infections pneumococciques, comme l'a montré Widal pour l'infection éberthienne, non pas seulement une réaction d'immunité, mais bien une réaction apparaissant déjà au cours de la période d'infection.

Cette technique de la séro-réaction pneumococcique étant différente de la technique usuelle, nous la décrirons en détail.

Pour les recherches expérimentales, le sérum est recueilli par les procédés ordinaires, par la saignée carotidienne chez le lapin, fémorale chez le chien. Pour les recherches cliniques, la piqûre du doigt ne donne pas une assez grande quantité de sang; il faut recourir à la prise aseptique du sang, dans l'une des veines superficielles du coude, au moyen d'une aiguille enfoncée directement dans la veine et adaptée, au niveau de son pavillon, à un petit tube en caoutchouc.

Cette dernière technique, que nous avons employée au début pour nos recherches de contrôle, et qu'on ne peut évidemment pas faire entrer dans la pratique journalière, n'est pas indispensable pour l'étude de la séroréaction pneumococcique. Il n'est pas, en effet, nécessaire d'avoir à sa disposition un sérum rigoureusement aseptique; les germes saprophytes de la peau ne se développent que très lentement dans le sérum humain : il suffit

1. Bordet. Ces *Annales*, 1895, p. 492.
2. Metchnikoff. Ces *Annales*, 1891, p. 371.
3. Mosny. *Archives de Médecine exp.*, 1892, page 288.

d'utiliser le sang fourni par l'application d'une à deux ventouses scarifiées. La peau est soigneusement nettoyée d'abord au savon, puis lavée à l'éther; les ventouses sont préalablement stérilisées au four à flamber. Le sang une fois recueilli, il vaut mieux le transvaser de suite dans un verre à expérience stérilisé et recouvert de papier; attendre la coagulation, puis la transsudation du sérum, et répartir alors en tubes à essai.

La quantité de sérum nécessaire pour la technique est de 1 à 2 c. c. environ. Le sérum ne doit pas être imprégné d'hémoglobine. Les tubes sont alors ensemencés avec une trace de culture de pneumocoque [1] et portés à l'étuve à 37° pendant 15 à 16 heures.

Au bout de ce temps, la culture doit être examinée à la fois à l'œil nu et au microscope. S'il s'agit de sérum de lapin normal, le milieu est trouble, sans dépôt, et l'examen microscopique y montre la présence d'innombrables pneumocoques encapsulés, nettement séparés les uns des autres et non groupés en amas; s'il s'agit de sérum humain normal, le sérum se trouble à peine, et si l'on prélève une goutte pour l'examiner au microscope, on y voit des diplocoques répartis uniformément dans le champ de la préparation, encapsulés, quelquefois groupés bout à bout, de façon à constituer une très courte chaînette de 3 à 4 grains.

Dans le cas d'infection pneumococcique, la culture peut se présenter sous deux aspects principaux : ou bien le sérum est demeuré clair, et l'on voit au fond du tube un précipité très net (*agglutination macroscopique*); ou bien le milieu est uniformément trouble, et le microscope est nécessaire pour déceler l'agglutination (*agglutination microscopique*).

1. La conservation de cultures vivantes de pneumocoque a passé longtemps pour très difficile, étant donné le peu de longévité de ce microbe, dans les milieux de culture usuels.

Il est cependant facile de conserver très longtemps le pneumocoque vivant en l'ensemençant dans le sang défibriné, additionné de sérosité d'ascite. Dans ce milieu, le microbe peut rester vivant pendant une année.

Dans le sang dilué comme dans les milieux contenant de l'hémoglobine, le pneumocoque se développe très souvent en chaînettes; repiqué sur gélose ou sur bouillon, le microbe conserve héréditairement cette propriété de se mettre en chaînettes. Il la perd par contre, si on l'ensemence dans le sérum de jeune lapin où il reprend sa forme typique de diplocoque encapsulé.

On n'ensemencera donc jamais directement le pneumocoque venant de sang dilué dans le sérum suspect; il faut toujours le faire passer auparavant, pour lui, rendre sa forme normale, dans le sérum de lapin.

1° *Agglutination macroscopique.* — Le précipité, visible à l'œil nu, peut être moulé sur l'extrémité inférieure du tube, ou bien se présente sous forme de fragments pseudo-membraneux multiples, aplatis, rubannés; de flocons irréguliers; de grains très fins, véritable poussière qui monte en suspension dans le sérum dès qu'on agite le tube : telles sont, rangées par ordre d'intensité décroissante, les réactions que l'on peut observer.

L'agitation ne suffit généralement pas pour amener la dislocation du précipité; il se reforme par le repos. Cependant, dans quelques cas, la désagrégation presque complète est possible, et, momentanément du moins, l'agglutination ne se reconnaît plus que si l'on vient à pratiquer l'examen microscopique.

2° *Agglutination microscopique.* — Le séjour à l'étuve fait perdre au sérum sa limpidité primitive: l'aspect trouble peut être plus ou moins accentué. Au microscope, on peut voir : des amas, des chaînettes ou un mélange d'amas et de chaînettes. Ces amas eux-mêmes peuvent être formés de diplocoques intimement accolés ou de chaînettes flexueuses entrelacées.

De la périphérie des amas, on voit fréquemment se détacher des chaînettes qui s'enroulent, forment, par leur ensemble, à l'ilot dont elles émanent, une sorte de collerette et lui donnent l'aspect dit en *tête de Méduse*.

En suivant jour par jour l'apparition et l'évolution de de l'agglutination pneumococcique, dans un cas clinique favorable, on peut saisir les différents aspects sous lesquels se manifeste le phénomène dans sa marche ascendante, et reconnaître tous les temps de la gradation que nous venons d'indiquer : chaînettes flexueuses entourées d'abondants diplocoques libres; chaînettes isolées, séparées les unes des autres par des espaces vides; chaînettes beaucoup plus longues, enlacées, enroulées sur elles-mêmes; chaînettes tellement pelotonnées qu'elles constituent de véritables amas.

Puis le phénomène s'accentue; les amas prennent de telles proportions qu'ils deviennent visibles à l'œil nu, en suspension dans le sérum ou précipités au foud du tube, et, si la force agglutinante est suffisante, ils se fondent en une masse unique,

1. Toutes choses égales, la culture en sérum est beaucoup plus riche en pneumocoques dans le cas d'infection pneumococcique que dans un cas témoin.

en un coagulum qui se moule sur le tube qui le reçoit et prend par suite l'aspect d'une cupule.

La constatation inverse peut être faite aisément si au lieu d'étudier une infection pneumococciques à sa période de début on la suit un certain temps pendant la convalescence. On voit alors le pouvoir agglutinant décroître, les fausses membranes se dissoudre en amas microscopiques, l'amas faire place à la chaînette et finalement la chaînette se résoudre en diplocoque.

Pour la netteté des préparations microscopiques, il est bon de ne pas se contenter de déposer une goutte de culture sur une lame et de la recouvrir d'une lamelle, comme lorsqu'il s'agit d'un sérodiagnostic de fièvre typhoïde, où l'appréciation de la mobilité du microbe entre en ligne de compte, et où, d'autre part, la réaction se continuant entre la lame et la lamelle ne doit pas être arrêtée par l'action de la solution colorante. Il en est autrement avec le pneumocoque. Le phénomène est achevé lorsqu'on a recours au microscope; il peut être déjà très net, macroscopique, au bout de 7 heures, et il est bien rare qu'on fasse l'examen avant 24 heures. On peut donc étaler, sécher et colorer la goutte de culture prélevée dans le tube à réaction : la mise au point est plus facile et les détails microscopiques plus apparents.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

A différentes reprises, nous avons nous-mêmes étudié, au point de vue de l'agglutination, le sérum des animaux vaccinés contre le pneumocoque. Nous avons toujours facilement constaté l'existence de cette propriété : si l'on ensemence avec du pneumocoque un tube de sérum de lapin vacciné, on voit, après un séjour de vingt-quatre heures à l'étuve, que bien loin de se troubler comme le fait le sérum de lapin sain ensemencé avec le pneumocoque, le milieu de culture reste limpide, et qu'il se fait au fond du tube un léger dépôt, formé de longues chaînettes de pneumocoques non capsulés, chaînettes qui sont tantôt isolées, tantôt enchevêtrées en amas. On ne voit pas de diplocoques dans les grands vides que laissent entre eux les amas.

Pour nous approcher le plus possible des conditions de la clinique humaine, nous avons cherché à produire, chez les

animaux, des affections lentes non généralisées, permettant la survie. Nous y sommes parvenus en modifiant le degré de réceptivité du lapin, en augmentant la résistance de son organisme vis-à-vis du pneumocoque, en le vaccinant incomplètement par l'injection de culture à virulence atténuée, ou d'exsudation stérilisée par le séjour à 55°, etc : inoculation qui fait ainsi de son organisme, primitivement très sensible au pneumocoque, un terrain relativement réfractaire.

L'immunité ainsi obtenue n'est pas solide, elle n'est que partielle. Si l'on injecte ultérieurement une dose considérable de pneumocoques, mortelle pour les animaux témoins, le lapin ne succombe pas à la septicémie, il peut même être complètement indifférent à cette épreuve : il n'est pas rare, cependant, qu'il présente des lésions cutanées, viscérales ou articulaires [1], qui rappellent les infections localisées de la clinique humaine. C'est le sérum de ces animaux sacrifiés en pleine période d'état de l'infection que nous avons étudié au point de vue de l'agglutination.

Le sérum des animaux infectés expérimentalement par le pneumocoque, ensemencé dans les conditions que nous venons d'indiquer, et mis à l'étuve le temps nécessaire, non seulement ne se trouble pas, comme fait le sérum d'un lapin neuf, non seulement possède la propriété agglutinative déjà observée par nous chez les animaux vaccinés, mais il la présente à un degré beaucoup plus élevé. L'intensité du phénomène est telle que tous les pneumocoques sont comme précipités au fond du tube et forment par leur cohésion une véritable cupule couenneuse, qui ne se dissocie pas par agitation du tube. Au-dessus, le sérum demeure clair; le microscope n'y décèle pas de pneumocoques en suspension. La dilacération du coagulum et l'examen microscopique, après coloration, montrent qu'il est constitué par des amas compacts de diplocoques ou de chaînettes. Un autre caractère qui apparaît très nettement si l'on a coloré la préparation à l'aide du bleu phéniqué Kuhne, c'est la disparition de la netteté des capsules autour des pneumocoques agglutinés. Le contraste est surtout frappant si l'on examine comparativement des pneumocoques cultivés en sérum

1. Bezançon et Griffon. *Arch. de méd. expér et d'anat. pathologique*. Novembre 1899.

de lapin sain, pneumocoques dont les capsules prennent une teinte mauve qui les rend très apparentes.

Les lapins sur lesquels ont porté nos recherches ne présentaient pas tous un sérum doué au même degré de la propriété d'agglomérer le pneumocoque.

Chez une partie d'entre eux, la culture en sérum donnait non un coagulum unique, mais plusieurs fragments pseudo-membraneux : à un degré moindre c'étaient des flocons, parfois si fins, qu'ils constituaient une véritable poussière. Chez d'autres le sérum, au lieu de demeurer clair, se troublait, et alors, au microscope, au lieu de voir des amas séparés par des espaces vides, on constatait entre ces amas des diplocoques disséminés ou des chaînettes libres. Ces différents aspects représentent des degrés de l'intensité du pouvoir agglutinatif.

Dans les cas de pouvoir agglutinatif maximum, nous avons pu même aller plus loin, et essayer la méthode des dilutions qui est d'une application courante en matière de bacille d'Eberth. Or, le sérum d'un de nos lapins (lapin Y), dilué dans la proportion d'une goutte de sérum pour 50 gouttes de bouillon, ensemencé, mis à l'étuve et examiné au bout de 24 heures, nous a ainsi donné une agglutination non douteuse, à l'œil nu comme au microscope. Mais le fait est exceptionnel et trop inconstant pour que le procédé des dilutions soit systématiquement appliqué, même dans les infections expérimentales, à la recherche de l'agglutination pneumococcique.

Dans ce cas où la propriété agglutinante pouvait être mise en évidence dans un sérum dilué, la proportion du mélange devait demeurer faible ; l'agglutination disparaissait quand la dilution atteignait le chiffre de 1 pour 75 ; on est donc ici bien loin des chiffres de dilution couramment constatés dans la fièvre typhoïde, 1 pour 200, 1 pour 1,000, 1 pour 5,000, et même au delà !

Atténuation et disparition du phénomène. — Si, dans le cours des expériences, au lieu de sacrifier les lapins lorsque les lésions pneumococciques sont encore en pleine évolution aiguë, on laisse celles-ci passer à l'état chronique ou se réparer, le sérum des animaux perd peu à peu sa force agglutinative, et la réaction, un moment visible à l'œil nu, n'est plus bientôt décelable que par l'examen microscopique.

Bien plus, il nous est arrivé maintes fois d'étudier le sérum de lapins qui, plusieurs mois auparavant, avaient été soumis, à une ou à plusieurs reprises, à l'infection pneumococcique, et de n'y plus trouver que peu ou pas de traces de pouvoir agglomérant. L'agglutination pneumococcique finit donc par disparaître chez le lapin au bout d'un temps relativement court; cette notion est à rapprocher de ce que nous avons observé en matière de vaccination antipneumococcique : l'immunité du lapin contre le pneumocoque, si elle n'est pas entretenue par des inoculations répétées, est toujours éphémère.

RECHERCHES CLINIQUES

Nous avons pratiqué la recherche de la séroréaction pneumococcique chez 186 individus, dont 64 atteints de lésions variées dues au pneumocoque, 22 chez lesquels le rôle pathogène du pneumocoque n'était d'abord pas évident, 100 sujets sains ou souffrant d'affections non pneumococciques : ces derniers constituant des cas témoins.

La fréquence de la pneumonie, la régularité de son évolution, le contrôle qu'apportent à son diagnostic les simples données de la clinique faisaient de cette affection la maladie de choix pour l'étude primordiale de la séroréaction pneumococcique.

Nos recherches ont porté sur 39 cas de pneumonie lobaire primitive et sur 6 cas de pneumonie secondaire.

Dans tous ces cas nous avons constaté l'apparition de la réaction agglutinante au cours de la maladie. L'époque d'apparition du phénomène est un peu variable : la réaction peut parfois être déjà esquissée le 3e ou 4e jour de la maladie, exceptionnellement elle est déjà très accentuée à cette période. En général elle n'est bien marquée que la veille de la défervescence, et son maximum coïncide très souvent avec la fin des phénomènes critiques, quelquefois seulement avec le premier jour de la convalescence.

L'intensité du phénomène va croissant jusqu'à l'époque de la défervescence : d'abord purement microscopique, la réaction

devient bientôt visible à l'œil nu, les pneumocoques s'agglutinent sous la forme de grumeaux, puis de fragments pseudo-membraneux, et enfin d'une véritable cupule.

Dans la convalescence de la pneumonie, on peut de bonne heure assister à la diminution graduelle du pouvoir agglutinant du sérum. Nos observations nous ont montré, souvent, la disparition précoce de cette propriété qui diminue déjà au bout d'une semaine, mais peut persister cependant un mois, cinq semaines, peut être même davantage.

La séroréaction pneumococcique, relativement si éphémère, ne pourrait donc permettre, comme la réaction de Widal, un diagnostic rétrospectif à longue échéance.

La réaction agglutinante existe aussi dans les phénomènes secondaires à la grippe, à la fièvre typhoïde; dans ce dernier cas, on peut trouver simultanément la réaction de Widal et la réaction pneumococcique. Ce pouvoir agglutinatif est en général très intense. C'est là une confirmation des expériences entreprises par MM. Widal, Sicard et Nobécourt, sur l'agglutination dans les infections disparates se superposant chez le même individu : chacune d'elles impressionne les humeurs de l'organisme pour son propre compte [1].

Dans les broncho-pneumonies à pneumocoque, les lésions pneumococciques sans pneumonie, pleurésie purulente, endocardite, etc., la réaction pneumococcique a toujours été positive.

La réaction fut également positive dans un cas d'arthrite purulente à pneumocoque examiné par M. Widal [2] en collaboration avec M. Lesné; le sérum donnait, dans ce cas, une agglutination macroscopique.

La réaction agglutinante n'a manqué que dans 6 cas, d'ailleurs de même ordre: il ne s'agissait plus de lésions pneumococciques localisées, mais de cas dans lesquels le pneumocoque avait déterminé une infection sanguine généralisée, mortelle.

Nous avons enfin constaté la présence du pouvoir agglutinant dans le sang de malades atteints d'affections dont la nature pneumococcique, déjà soupçonnée, n'est cependant pas encore établie d'une façon certaine par la clinique et les recherches

1. Widal. Les associations microbiennes et les infections mixtes. *Cong. de méd. de Montpellier*, 13 avril 1898.
2. Widal et Lesné. *Société médicale des hôpitaux*, 6 mai 1898.

bactériologiques. Il s'agit de malades atteints d'angine aiguë non diphtérique (9 cas); de grippe (4 cas); de purpura (2 cas); de granulie (3 cas); de tuberculose pulmonaire chronique avec fièvre hectique.

La présence d'une réaction agglutinante vis-à-vis du pneumocoque dans ces diverses maladies n'est pas pour nous étonner : on sait la fréquence des infections secondaires pneumococciques, dans la grippe et dans la tuberculose: le pneumocoque a pu être constaté directement dans le sang des individus atteints de purpura.

Dans les angines enfin, cette constatation vient à l'appui de l'opinion soutenue déjà par l'un de nous avec M. Widal [1], de la réserve avec laquelle doit être porté le diagnostic d'angine à streptocoque, puisque, même dans les cas où le streptocoque pullule et prédomine dans les tubes de culture de l'exsudat amygdalien, la séroréaction agglutinante décèle la participation du pneumocoque au processus pathologique. La présence du pneumocoque à la surface de l'amygdale, aussi constante, comme nous l'avons établi ailleurs, que celle du streptocoque, rend aisément compte de l'entrée en scène du pneumocoque.

A des degrés différents, avec des prédominances (streptocoque, pneumocoque, eté.), toute angine aiguë est une infection polymicrobienne.

* * *

Tandis que dans la fièvre typhoïde on peut, comme l'ont montré MM. Widal et Sicard, rechercher la réaction agglutinante avec un échantillon quelconque de bacille d'Eberth (puisque 26 échantillons étudiés par eux se sont trouvés agglutinés à un taux sensiblement analogue par le même sérum de typhique) dans les infections à pneumocoque, au contraire, la réaction agglutinante semblerait parfois faire défaut si l'on se contentait de la rechercher vis-à-vis d'un échantillon quelconque de pneumocoque.

Comme nous l'avons observé plusieurs fois, un sérum de pneumocoques qui n'agglutinait pas l'échantillon de pneumocoque que nous entretenons dans notre laboratoire, et qui a servi à nos expériences, (pneumocoque retiré il y a trois ans des crachats d'un pneumonique), agglomérait par contre le pneumo-

1. Widal et Besançon. Nécessité d'une revision des angines dites à streptocoques. *Société médicale des hôpitaux*, 13 mars 1896.

coque que nous avions isolé de la bouche du malade auquel était fait le prélèvement de sérum [1].

1. Le tableau ci-joint montre les variations du pouvoir agglutinatif, selon que le sérum est ensemencé avec le pneumocoque, retiré de la lésion, ou de la bouche du malade, ou avec le pneumocoque du laboratoire, ou un échantillon quelconque : l'agglutination macroscopique en cupule est représentée par la lettre M, l'agglutination microscopique par la lettre m. Lorsque l'agglutination a été étudiée à plusieurs reprises, le fait est indiqué.

PNEUMONIES	PNEUMOCOQUE DU MALADE	PNEUMOCOQUE DU LABORATOIRE	AUTRE PNEUMOCOQUE
Observ. 1	M	m	—
2	—	M	m
3	M	m, puis M	—
4	M	négatif, puis M	négatif
5	—	M	m
	M	m	
6	M	M	
	M	m	
7	—	M	négatif
8	M	m	négatif
9	M	négatif	
	m	négatif	
10	M	m	
	M	M	
11	M	négatif	
12	m, puis M	négatif, négatif.	
13	négatif	négatif	
	M	m	
	négatif	négatif	
	m	m	
14	M	m	
	M	M	
	M	négatif	
15	M	M	
16	M	m	
17	M	négatif	
18	m	négatif	négatif
19. (Pn. secondaire)	M	négatif	m
20. id.	m	négatif	
21. id.	M	M	M[1]
22. (Pleurésie purul.)	M	négatif	
23. (Spléno-pneumonie)	M	négatif	négatif
24. (Granulie)	M	négatif	négatif

1. Ce sérum a été ensemencé avec 3 autres échantillons de pneumocoque : avec les 2 premiers, agglutination microscopique ; avec le 3e, pas d'agglutination.

Ces cas où le sérum des pneumoniques n'agglutine pas un échantillon quelconque de pneumocoque ont été relativement rares. Le plus souvent le même sérum agglutinait à la fois le pneumocoque du laboratoire et l'échantillon de pneumocoque que nous retirions de la bouche du malade ; mais la réaction présentait dans ces deux cas des degrés différents : l'agglutination étant toujours plus intense avec le pneumocoque de la gorge du malade qu'avec celui du laboratoire. Ainsi quand la réaction n'était qu'esquissée avec le pneumocoque du malade, elle manquait totalement avec le pneumocoque du laboratoire ; quand, l'intensité du pouvoir agglutinatif augmentant graduellement avec l'évolution de la maladie, on obtenait un résultat macroscopique avec le pneumocoque de la gorge du malade, la réaction n'était encore visible qu'au microscope avec le pneumocoque du laboratoire, et c'est seulement lorsque le pouvoir agglomérant atteignait son degré maximun, que les deux échantillons pneumococciques étaient tous les deux agglutinés à l'œil nu d'une façon sensiblement égale. Ainsi, lorsque le sérum est doué d'un pouvoir agglutinatif très intense, il impressionne presque tous les échantillons de pneumocoque qu'on met à son contact : le sérum d'un de nos malades agglutinait cinq échantillons différents de pneumocoque, il n'agglutinait pas cependant un sixième échantillon qui était facilement agglutiné par contre par le sérum même du malade chez qui il avait été prélevé.

Inversement, lors de la décroissance progressive de l'intensité de la réaction, c'est le pneumocoque de la gorge du malade qui conserve le dernier la faculté d'être agglutiné.

Le fait que le sérum des individus infectés par le pneumocoque agglutine toujours davantage et quelquefois même exclusivement l'échantillon de pneumocoque qui se trouve dans la bouche du malade, cadre bien avec notre conception actuelle de la pneumonie, maladie autochtone dans le plus grand nombre des cas, ne relevant pas d'une infection venue de l'extérieur, mais reconnaissant pour cause la migration descendante d'un parasite permanent de notre organisme, le pneumocoque salivaire, saprophyte constant[1] de notre cavité bucco-pharyngée.

Cette notion de la pluralité des échantillons pneumococci-

1. Bezançon et Griffon. Présence constante du pneumocoque à la surface de l'amygdale. (*Société Médicale des Hôpitaux*, 15 avril 1898).

ques décelée par l'agglutination, et d'autre part ce fait que le sérum des malades agglutine toujours davantage l'échantillon même de pneumocoque qui a déterminé la maladie, nous amènent à discuter la valeur de la réaction agglutinante pour la classification des espèces microbiennes.

* * *

Les résultats fournis par la séroréaction agglutinante pour le diagnostic différentiel des microbes ont une valeur inégale suivant la nature de l'espèce microbienne expérimentée. Tandis que, pour le bacille d'Eberth, cette méthode est absolument rigoureuse, puisque, comme l'ont vu MM. Widal et Suard, tous les échantillons de bacille d'Eberth sont impressionnés d'une façon sensiblement égale par un même sérum agglutinant, il n'en est déjà plus tout à fait de même pour le vibrion cholérique. Les divers échantillons de ce microbe ne se comportent pas tous de la même façon vis-à-vis de l'agglutination. Si un sérum d'animal vacciné contre le vibrion indien agglutine bien aussi les autres vibrions cholérigènes, il est sans action sur le vibrion de Massouah ; d'autre part, MM. Widal et Nobécourt ont montré qu'un même sérum, possédant un pouvoir agglutinatif à peu près identique pour les échantillons provenant d'épidémies européennes (Hambourg, Constantinople, Paris), présentait au contraire un pouvoir beaucoup plus faible, presque nul même, vis-à-vis d'un échantillon isolé des selles d'un cholérique de l'Inde.

La réaction agglutinante qui, pour le bacille d'Eberth est pour ainsi dire le privilège de l'espèce, quelle que soit la source de l'échantillon microbien, n'est plus, pour le choléra, l'apanage de l'espèce et semble devenir déjà une qualité inhérente à chaque race cholérigène.

Pour les microbes qui vivent à l'état saprophytique dans l'organisme humain (pneumocoque, colibacille, etc.) la réaction devient encore, si l'on peut dire, moins spécifique. Pour le pneumocoque, nous l'avons vu, un sérum qui agglutine un échantillon de pneumocoque peut rester sans action ou presque sans action sur un autre échantillon pneumococcique ayant les mêmes caractères que le premier, mais provenant d'une autre source.

Pour le colibacille, Durham a vu que le sérum d'un animal

immunisé par un échantillon de colibacille, agglutine cet échantillon, mais n'agglutine pas ou n'agglutine que faiblement les autres colibacilles. M. Achard a fait une constatation analogue dans un cas. MM. Widal et Nobécourt ont montré, par des mensurations exactes du pouvoir agglutinatif des sérums, que les différents échantillons de colibacilles, recueillis sur l'homme sain ou malade, malgré leur aspect de similitude, sont complètement distincts. Pour M. Nobécourt, qui a repris cette étude dans sa thèse de doctorat, l'agglutination ne permet pas de caractériser une race spéciale de colibacille particulière aux infections gastro-intestinales aiguës d'été des jeunes enfants. Contrairement à l'opinion de M. Lesage, le sérum de chaque enfant n'agglutine que le colibacille retiré des selles du malade, et non le colibacille retiré d'un cas voisin.

Au début de nos recherches sur l'agglutination du pneumocoque[1], nous avions cru pouvoir parler de différenciation de races pneumococciques par la réaction agglutinante. Nous avons vainement recherché, depuis, si les lésions humaines déterminées par les différents échantillons séparés par l'agglutination, ne différaient pas en quelque point; si, pour prendre un exemple, la réaction agglutinante ne séparait pas le pneumocoque de la pneumonie franche de celui des pneumonies bâtardes, infectantes. Or, aucune classification n'a été possible, et, seul, de l'analyse de toutes nos observations, s'est dégagé ce fait que le sérum du malade agglutinait toujours davantage le pneumocoque qui avait déterminé la lésion, et que parfois même il n'agglutinait que cet échantillon.

Le terme de race nous paraît donc impropre aujourd'hui pour caractériser des variétés de pneumocoques décelées par l'agglutination. Ce n'est pas parce qu'un pneumocoque est agglutiné par un sérum, tandis qu'un autre ne l'est pas, qu'il appartient à une race distincte : car il faudrait alors admettre qu'il y a presque autant de races de pneumocoques que de sujets atteints d'infection pneumococcique.

La réaction agglutinante nous apparaît, pour les espèces saprophytes, comme un réactif trop délicat pour servir de base à une classification, elle sépare non pas des espèces, non pas même des races, mais des échantillons microbiens.

1. Bezançon et Griffon, *Presse médicale*, 31 juillet 1898.

Pour ce qui est, en effet, de ces microbes saprophytes, chaque échantillon acquiert, du fait de son séjour dans l'être qui l'héberge, une sorte d'individualité.

Cette individualité ne se décèle ni par des caractères différents de morphologie ou de culture, ni par des lésions dissemblables si le microbe devient pathogène. Quelle que soit sa source, le pneumocoque détermine dans le parenchyme pulmonaire une réaction pathologique toujours identique à elle-même, l'alvéolite fibrineuse. L'individualité de l'échantillon microbien ne se traduit que dans les réactions humorales, par des différences dans la séroréaction agglutinante, par exemple, et peut-être aussi, par des réactions vaccinales distinctes [1].

1. Il est du plus haut intérêt d'établir si un sérum préventif à l'égard de l'échantillon de pneumocoque qui a servi à la vaccination, préserve également contre tout autre échantillon de pneumocoque. Des expériences actuellement en cours nous fixeront sur ce point.

Dès aujourd'hui, nous croyons pouvoir mettre en relief combien le fait que la séroréaction agglutinante, en ce qui concerne le pneumocoque et le colibacille, est une réaction quasi individuelle, éclaire la question si controversée de l'unité ou de la pluralité des races streptococciques. Si, pour des raisons de technique, la séroréaction agglutinante n'a pu être appliquée à la solution de cette question il n'en est pas de même de la réaction d'immunité de Pfeiffer. Or, toutes les recherches expérimentales aboutissent à cette conclusion que, pour le streptocoque, le sérum d'animaux vaccinés n'a de propriétés préventives ou thérapeutiques réelles que vis-à-vis de l'échantillon de streptocoque qui a servi à la vaccination. Il ne s'ensuit pas que tous ces échantillons différents constituent des espèces streptococciques distinctes. De même que la réaction agglutinante pour le pneumocoque, la réaction d'immunité ne peut, pour le streptocoque, suffire à établir une classification en espèces différentes.

Loin d'être en désaccord, comme on aurait été tout d'abord tenté de le croire, avec la théorie de l'unité des races streptococciques soutenue par l'un de nous avec M. Widal* et admise par M. Marmorek**, ces notions nous ramènent, après une nouvelle étude du problème, à la conception uniciste qui seule cadre avec l'observation clinique.

* Widal et Bezançon. Les streptocoques de la bouche normale et pathologique. *Société Médicale des hôpitaux.* Séance du 27 juillet 1894.

** Marmorek. *Annales de l'Institut Pasteur,* année 1895, page 593.

ERRATUM

Dans l'article de M. Metchnikoff, inséré dans le dernier n° des *Annales,* il s'est glissé une erreur qu'il faut corriger ainsi : p. 371, ligne 18, au lieu de « ce complément », lire : « la substance intermédiaire ».

DE L'INFLUENCE DE LA TOXINE TÉTANIQUE
SUR LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

Par MICHEL JOUKOWSKY

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Les modifications qui se produisent sous l'influence de la toxine tétanique ont été déjà étudiées à plusieurs reprises, et surtout depuis l'introduction dans la technique histologique de la méthode de Nissl pour la coloration des cellules nerveuses. Cette méthode, si précieuse pour dévoiler la structure de ces cellules, ne fournit pourtant pas des conclusions précises quant à l'anatomie pathologique. Comme preuve à l'appui de ce que je viens de dire, je vais citer quelques récents travaux, laissant de côté les études anciennes.

La méthode de Nissl fut appliquée pour la première fois à l'étude du système nerveux dans l'intoxication tétanique par Beck (1) et Nissl (2) lui-même, ensuite par Marinesco (3). Ce dernier a, comme les deux premiers, observé dans les cellules de la moelle épinière, la raréfaction et la dissolution de la substance chromatophile, la désintégration et coagulation du protoplasma. Il décrivit des hémorragies dans les cornes antérieures et postérieures de la moelle (surtout dans les cornes antérieures), et en outre il signala une augmentation du nombre des noyaux de la névroglie.

Goldcheider (4) et Flatau firent de nombreuses expériences avec la toxine tétanique ainsi qu'avec l'antitoxine, et arrivèrent à la conclusion que la toxine tétanique produit un gonflement des noyaux, une augmentation partielle et plus tard la désagrégation des corpuscules de Nissl, enfin une augmentation de volume de la cellule tout entière. Ces modifications sont d'autant plus nettes que l'intensité du virus est plus grande. D'après

ces observateurs, les cellules ne réagissent pas toutes de la même façon, de sorte qu'on peut voir différents états dans des cellules voisines. Il existe aussi une différence dans le degré des modifications morphologiques selon l'animal. Ils n'ont pas remarqué de corrélation précise entre l'intensité des phénomènes de l'intoxication et le degré de modification anatomo-pathologique.

Hunter (5), à l'examen des moelles épinières de trois personnes mortes de tétanos, trouva dans le premier cas une forte congestion, une hémorragie interstitielle et des modifications insignifiantes des cellules; dans le second cas, congestion, changements cellulaires insignifiants et absence d'hémorragie; enfin, dans le troisième cas, congestion et absence de changements histologiques.

La même année, Claude (6) décrivit les changements particuliers qui se produisent à la suite de l'intoxication tétanique expérimentale, et dont les observateurs précédents ne font pas mention. Chez un chien qui avait reçu de faibles doses de toxine et qui survécut à cette intoxication, il constata, le vingt-troisième jour, une paralysie avec contracture, et à l'examen microscopique de la moelle épinière de cet animal, il trouva des modifications aussi bien dans le noyau des cellules que dans la substance chromatophile. Il y avait, en outre, des foyers de myélite, surtout autour des cornes postérieures et, enfin de faibles modifications dans les nerfs, le nerf sciatique en particulier.

Chantemesse et Marinesco (7) ont trouvé des modifications variées dans les cellules de la moelle des cobayes morts à la suite de l'intoxication tétanique. Ces modifications consistaient en un gonflement du corps cellulaire, une coloration diffuse de la substance chromatique, un épaississement de la membrane du noyau, une diminution de volume du nucléole, et une coloration du cylindre-axe qui devenait en outre granuleux. Si, en même temps que la toxine, on introduisait dans le corps de l'animal de l'antitoxine, on observait l'augmentation de volume des cellules du noyau et du nucléole : ce dernier était plus faiblement coloré.

Ces phénomènes disparaissaient au bout d'un certain temps.

Chez les cobayes qui ont reçu une dose mortelle de toxine et 24 heures plus tard une dose thérapeutique de sérum (l'animal

fut sacrifié le cinquième jour), on constata la faiblesse de coloration, la désintégration de la substance chromatophile et la chromatolyse. Chez un cobaye ayant reçu de la toxine et de l'antitoxine et sacrifié au bout de 75 heures, la moelle ne présentait aucun changement.

Matthis (8) étudia deux cas de tétanos chez l'homme. Un a duré 17 jours et l'autre 12. Dans le premier, à l'examen anatomo-pathologique, on trouva une forte hyperémie et des hémorragies, ainsi que des modifications cellulaires consistant en un gonflement des corpuscules de Nissl, en leur fine désagrégation, en une accumulation du pigment dans les cellules et une diminution de nombre de leurs prolongements. Le nucléole dans plusieurs cellules était fortement coloré et d'un aspect anguleux. Quelquefois il devenait plus clair ou bien désagrégé.

Dans le second cas, on ne constata aucune modification dans les cellules de la moelle. C'est pourquoi l'auteur ne considère pas les modifications du premier cas comme propres au tétanos. Elles sont, selon lui, dues en partie à l'hyperémie de la moelle.

Donetti (9), non plus que Matthis, ne considère pas ces altérations comme symptomatiques du tétanos : la contracture, selon lui, est un phénomène réflexe ne dépendant point des lésions spéciales ni du système nerveux central, ni des nerfs, ni des muscles. Dans un cas de tétanos qu'il a étudié chez l'homme, il constata l'existence d'une myélite aiguë centrale avec atrophie des cornes antérieures, et destruction des grandes cellules pyramidales. Les lésions pathologiques s'étaient localisées dans la partie lombaire de la moelle autour du canal central, bien que les contractures fussent généralisées.

Péchoutre (10), de même que les auteurs précédents, ne considère pas les lésions qu'on rencontre comme propres au tétanos. Dans le tétanos expérimental chez les lapins, il trouva, comme chez l'homme, des altérations des cellules portant sur les éléments chromatophiles et le noyau. Ces altérations sont les suivantes : augmentation de volume de la cellule, coloration diffuse de la substance chromatophile, dissémination irrégulière des granulations de Nissl, disparition partielle ou totale des contours de la cellule, augmentation de volume et de coloration du noyau, qui se plaçait excentriquement, et enfin amplification du

nucléole. Telles sont les modifications que l'auteur a rencontrées dans plusieurs cas.

Rispal (11) a étudié deux cas de tétanos chez l'homme. Dans l'un il rencontra le gonflement et la chromatolyse des cellules des cornes antérieures de la moelle; dans l'autre la dégénérescence hyaline et la déformation du noyau dans la même région. Dans le premier cas, les modifications étaient semblables à celles qu'on rencontre dans l'empoisonnement par la toxine tétanique. Quant au second, les altérations rappelaient celles qui se produisent sous l'influence d'une haute température.

Nageotte et Ettlinger (12) ont observé la chromatolyse, la vacuolisation et la fissuration des cellules dans l'intoxication par la toxine tétanique. Les altérations n'étaient ni constantes, ni en corrélation avec les contractures.

Courmont, Doyon et Paviat (13) donnent une description détaillée des phénomènes pathologiques chez les animaux, aussi bien dans le tétanos généralisé que dans le tétanos localisé, tant chez les animaux sacrifiés que chez ceux qui moururent spontanément. La contracture tétanique n'est pas pour eux une fonction des centres nerveux.

Nuck et Moor (14) observèrent, dans le système nerveux central des cobayes, des modifications semblables à celles dont parlent Nageotte et Ettlinger. Ils partagent aussi l'avis de Courmont et de Paviat sur la non spécificité de ces lésions. D'après eux, ces lésions se rencontrent dans d'autres infections, et leurs localisations ne correspondent pas aux contractures. Ces dernières dépendent très probablement, non du système nerveux central, mais de l'intoxication de la partie périphérique du neurone.

Après ce résumé sommaire des travaux existants, je passe à mes propres recherches faites au laboratoire de M. le professeur Metchnikoff et sous sa haute direction.

Mes expériences ont été faites sur des cobayes, qui furent intoxiqués par la toxine tétanique sèche. Les doses ont varié de 0,005 de millig. à 0,01, 0,04, 0,1 de milligr., de sorte que j'ai observé des cas aigus aussi bien que des cas chroniques.

Pour l'examen microscopique, on prenait des coupes sur des animaux sacrifiés, soit après l'apparition des phénomènes du

tétanos généralisé, soit quand ils ne présentaient que les contractures localisées, et enfin sur ceux qui succombaient spontanément.

En outre, j'ai pu examiner le système nerveux central d'un homme mort du tétanos. Ce cas a été mis à ma disposition par M. le professeur P. Marie, auquel je présente mes remerciements.

Dans toutes mes expériences, la moelle a été traitée par la méthode de Nissl, avec substitution du bleu de toluidine à la place du bleu de méthylène. Cette modification de la méthode de Nissl a les avantages suivants : avec la toluidine, la coloration des cellules nerveuses est plus intense, elle se conserve mieux; les leucocytes, les noyaux de la névroglie et ceux de l'endothélium des vaisseaux se colorent aussi très bien. Dans plusieurs cas, j'avais associé cette coloration à une autre faite avec une faible solution d'éosine. Je trouve cette combinaison très utile, car, outre que les cellules nerveuses, les noyaux de la névroglie et les leucocytes sont colorés par le bleu de toluidine, on obtient aussi la coloration en rose des mailles de la névroglie et des globules rouges du sang. De sorte que, sur des préparations traitées par ces procédés, on observe mieux les modifications subies par les vaisseaux du tissu nerveux, que sur celles traitées par la méthode pure de Nissl.

Les modifications du système nerveux central que j'ai étudiées sur de nombreux cobayes et sur un homme sont si variées que je ne veux pas en faire d'emblée une liste. Je préfère décrire séparément l'intoxication aiguë et l'intoxication chronique. Ensuite, j'indiquerai lesquelles des modifications paraissent être les plus fréquentes, et lesquelles ne se rencontrent que très rarement.

J'ai constaté que sur les coupes du système nerveux central des cobayes adultes, empoisonnés par des doses mortelles de toxines et sacrifiés après l'apparition des phénomènes tétaniques généralisés, les modifications des cellules nerveuses étaient si insignifiantes, que dans un cas il fut même impossible de percevoir la moindre différence entre les cellules nerveuses de ces coupes et celles du système nerveux normal.

Dans d'autres coupes, on voyait un petit nombre de cellules présentant la raréfaction de la substance chromatophile, et des cellules ayant subi la chromatolyse périphérique. Ces dernières

étaient disséminées tout le long de l'axe cérébro-spinal, sans aucune corrélation avec les régions des contractures. On rencontrait aussi des cellules colorées en bleu foncé sans délimitation précise des corpuscules de Nissl, mais ayant le noyau coloré et la substance achromatique.

Le plus souvent, les cellules modifiées se rencontraient dans le groupe antérieur des cornes antérieures de la moelle et tout autour du canal central.

Ce qui prédominait dans les cas d'empoisonnement aigu, c'est l'augmentation de nombre des cellules rondes migratrices autour des cellules nerveuses, dans les espaces péricellulaires et sur les bords de ces espaces. Là, elles s'accumulaient en quantité beaucoup plus grande qu'à l'état normal.

Sur certaines coupes on voyait ces cellules migratrices entourer la cellule nerveuse et même pénétrer dans son protoplasma, où on trouvait une, deux et même plusieurs de ces cellules migratrices. Ce phénomène s'observait surtout dans les cas d'intoxication chronique, plus rarement dans l'empoisonnement aigu.

Il se rencontrait dans les parties de la moelle qui entourent le canal central et dans les cellules du groupe antérieur des cornes antérieures; dans le groupe externe des cellules on le voyait plus rarement.

Le même phénomène se reproduisait dans le bulbe.

Les cellules nerveuses autour desquelles s'accumulaient les éléments migrateurs, avaient la substance chromatophile en état de raréfaction, ou bien présentaient le phénomène de la chromatolyse partielle. Dans d'autres cas, elles paraissaient être tout à fait normales quant à l'état morphologique, c'est-à-dire que la méthode de Nissl ne divulguait aucune modification, sauf cependant ceci : à l'endroit même où la cellule ronde migratrice pénétrait dans la cellule nerveuse, on remarquait la disparition de la substance chromatophile.

Les cellules migratrices qui s'accumulaient autour de la cellule nerveuse, étaient souvent plus riches en substance chromatophile que celles qui étaient disséminées dans le tissu environnant.

Quant à la nature de ces cellules migratrices, les unes, par leur aspect extérieur, rappelaient parfaitement les leucocytes

mononucléaires, tandis que d'autres semblaient être les noyaux de la névroglie.

Chez deux cobayes nouveau-nés, intoxiqués par des doses mortelles (dont l'un fut sacrifié 30 heures après l'injection de la toxine, ayant une contracture partielle d'une patte postérieure, l'autre 52 heures après, présentant les signes du tétanos généralisé), les altérations consistaient principalement en une accumulation des cellules migratrices autour des cellules nerveuses. Chez le cobaye atteint de tétanos généralisé, on put voir que certaines cellules de la moelle avaient le nucléole éclairci.

Chez deux cobayes empoisonnés par des doses faibles de 0,005 de mgr., sacrifiés 7 jours après, ayant présenté des contractures partielles, on observa dans le système nerveux central les modifications suivantes :

Chez le premier cobaye, pesant 470 grammes, les cellules nerveuses avaient subi des altérations insignifiantes : certaines seulement présentaient la chromatolyse partielle, ou totale, mais ni le noyau, ni le nucléole ne paraissaient atteints. Ce qui prédominait dans ce cas, c'est l'augmentation considérable du nombre des cellules migratrices et leur pénétration dans le protoplasma des cellules. Ce phénomène s'observait tout le long de l'axe cérébro-spinal, aussi bien dans la moelle que dans le bulbe : il se localisait particulièrement autour des cellules du groupe antérieur des cornes antérieures, et tout autour du canal central. Dans la région lombaire de la moelle, ce phénomène était le plus manifeste. Sur plusieurs coupes du bulbe on l'observait aussi très nettement.

En comparant les coupes de ces deux cas avec celles prises sur les animaux ayant subi l'intoxication aiguë, on constate que ce phénomène est beaucoup plus prononcé dans les premières que dans les dernières. Dans certaines coupes de la moelle d'un des deux cobayes susmentionnés, on voyait parfois des cellules nerveuses, abondamment recouvertes de tous les côtés par des cellules migratrices qui y pénétraient par deux, trois et plus.

On observait le même phénomène dans le bulbe. Chez le second cobaye, pesant 520 grammes, ces phénomènes étaient légèrement atténués. En outre, chez cet animal, dans plusieurs cellules de la moelle et du bulbe, le nucléole avait disparu.

Chez le troisième, qui a reçu 0,04 de milligr. de toxine sèche,

qui a vécu 14 jours, et qui est mort avec contractures généralisées, j'ai constaté, outre l'accumulation des cellules rondes migratrices autour des cellules nerveuses et leur pénétration dans le protoplasma de ces dernières, que les cellules nerveuses mêmes ont subi des changements : leur substance chromatophile se raréfiait et ses corpuscules se divisaient en fines granulations : le nucléole des noyaux se gonflait. Souvent aussi le nucléole prenait une forme anormale d'un as de cœur, ou bien il devenait plus clair au milieu, et avait la circonférence teinte en bleu foncé.

On rencontrait enfin des cellules dans lesquelles le nucléole était finement désagrégé.

Dans d'autres cas chroniques (dont un que j'ai observé moi-même : la description des autres m'a été obligeamment communiquée par le docteur Maïkoff), les altérations du système nerveux central furent extrêmement variées. Ainsi dans un cas il y avait l'accumulation de la substance chromatophile autour du nucléole des cellules, dont le protoplasma se trouvait dans l'état de chromatolyse presque totale. Dans l'autre on voyait des cellules avec la chromatolyse centrale, ou bien encore des cellules ratatinées sans nucléole ni noyau, et colorées uniformément en bleu foncé. Dans un autre cas encore, on observait des cellules avec accumulation de la substance chromatophile autour du nucléole, et des cellules avec la substance chromatophile transformée en une poussière, avec des cellules faiblement colorées ayant la substance chromatophile raréfiée.

Telles sont les modifications cellulaires qu'on observa dans plusieurs cas. Une fois, dans un cas chronique, on ne constata que l'accumulation des cellules migratrices et une certaine raréfaction de la substance chromatophile.

Les cellules modifiées étaient disséminées dans différentes parties de la moelle ; elles n'avaient pas de corrélation avec les phénomènes physiologiques, il est impossible de leur assigner une localisation. On peut dire seulement qu'on les rencontrait plus souvent dans le groupe antérieur des cornes antérieures de la moelle, et autour du canal central.

On peut dire en général que dans ces cas, ainsi que dans les cas précédents, les phénomènes prédominants furent : l'accumulation des cellules migratrices autour des cellules nerveuses

et leur pénétration dans le protoplasma de ces dernières. Ces phénomènes se produisaient avec plus ou moins grande intensité, selon le cas, et ils étaient plus accusés dans l'intoxication avec évolution lente que dans celle à marche aiguë.

Je veux décrire maintenant les modifications que j'ai observées dans un cas de tétanos céphalique chez l'homme. Cette description complétera le tableau du tétanos expérimental chez les animaux (16).

Je résume, en quelques mots, la marche de cette maladie :

Les symptômes furent les suivants : trismus, paralysie double du nerf facial, accès d'étouffement. La maladie a duré 12 jours, dont les 4 premiers constituent la période d'incubation.

A l'autopsie on trouva une hyperémie de l'encéphale et de la moelle épinière. A l'examen microscopique du bulbe, de la moelle épinière et de la substance grise de l'écorce cérébrale, faite d'après la méthode de Nissl avec la coloration supplémentaire par l'éosine, on constata les altérations suivantes :

Sur les coupes prises sur l'écorce cérébrale, dans la région motrice, il y eut une forte augmentation de pigment jaune clair des cellules, surtout des cellules géantes. Cette augmentation fut parfois si forte que le pigment occupait plus de la moitié de la cellule, tandis que l'autre partie était remplie par la substance chromatophile parfaitement intacte.

Cette énorme quantité de pigment est un phénomène pathologique dû à la dégénérescence pigmentaire de la cellule. Le malade était, il est vrai, d'un âge avancé (61 ans), mais ce n'est pas l'influence de l'âge qui en fut la cause, car le phénomène a été trop intense. La même accumulation du pigment se rencontrait dans le bulbe et la moelle épinière. Dans cette dernière, c'était surtout les cellules des cornes antérieures de la région cervicale qui furent altérées. Ici, dans la plupart des cas, on observa les faits suivants : disparition totale ou bien presque totale de la substance chromatophile et sa substitution par des granules jaune clair, absence du noyau dans un grand nombre de cellules, tandis que, dans d'autres, ils existaient, mais étaient refoulés vers la périphérie. En outre, dans le bulbe ainsi que dans la moelle, surtout dans sa partie cervicale, et spécialement dans les cornes antérieures et autour du canal central, on ren-

contrait souvent des cellules avec chromatolyse centrale. Enfin, sur plusieurs coupes de la moelle ainsi que sur celles du bulbe, on pouvait voir des cellules dont les corpuscule de Nissl étaient gonflés. La substance achromatique, ainsi que le noyau, se coloraient en bleu foncé. Quant à l'accumulation des cellules migratrices autour des cellules nerveuses, on la rencontrait très rarement, et ce fut surtout sur quelques coupes de la moelle épinière.

Outre les modifications cellulaires, on observait dans ce cas une forte dilatation par le sang des vaisseaux du cerveau et de la moelle épinière, et sur certaines coupes du bulbe, des extravasations.

Les altérations pathologiques des cellules nerveuses qu'on a observées chez les animaux et chez l'homme dans les cas d'empoisonnement par la toxine sont très variées. Le plus souvent ce sont : la raréfaction de la substance chromatophile et la chromatolyse. Ces phénomènes étaient d'une intensité variable selon les cas, et même parfois ils faisaient défaut.

Selon l'opinion actuelle, la chromatolyse n'est pas un phénomène pathognomonique de telle ou telle maladie, mais elle se rencontre toutes les fois qu'il y a altération de l'intégrité antomique ou fonctionnelle de la cellule (Van Gehuchten). D'après une autre opinion, ce phénomène se produit pendant la vie de la cellule, et est plutôt biologique qu'anatomo-pathologique (Donetti).

Il semble qu'il faut admettre que la chromatolyse de la cellule nerveuse ne témoigne pas de l'altération des fonctions de la cellule et, comme preuve à l'appui de cette assertion, on peut citer le cas de Déjerine qui constata ces modifications des cellules nerveuses de la moelle chez une femme morte de pneumonie, et chez laquelle il n'y avait aucune modification ni dans les mouvements ni dans la sensibilité. C'est pourquoi, dans nos expériences, il est impossible d'attribuer à ce phénomène une signification spéciale.

Le signe le plus important de l'altération de la cellule nerveuse est la modification du noyau et du nucléole. Mais ce phénomène non plus n'était pas constant, il ne se rencontrait que dans quelques cas, c'est pourquoi il ne peut pas non plus

être considéré comme un signe caractéristique de l'empoisonnement par la toxine.

On peut dire la même chose de la pigmentation des cellules. Ce phénomène est encore moins caractéristique que les précédents, puisqu'il se rencontre dans le système nerveux pendant ses différents processus chroniques, ainsi que sous l'influence de l'âge (Obersteiner, Kosturine, Marinesco).

Quant aux cellules colorées uniformément en bleu foncé, sans délimitation distincte des corpuscules de Nissl, avec un noyau coloré et la substance achromatique, on peut en voir de pareilles sur des cerveaux d'animaux parfaitement sains.

La diversité des modifications des cellules, leur inconstance et la variation selon chaque cas, tout cela donne droit de ne pas compter ces altérations comme spécifiques de l'empoisonnement par la toxine du tétanos, et de ne les considérer que comme des phénomènes l'accompagnant.

Je ne veux pas dire par là qu'il n'existe point de ces signes spéciaux, mais il faudrait peut-être employer des méthodes d'investigation plus délicates encore que celles que nous appliquons.

Il existe cependant un phénomène qui se rencontre souvent dans l'empoisonnement par la toxine tétanique, c'est l'accumulation des cellules rondes migratrices autour des cellules nerveuses, et leur pénétration dans le protoplasma de ces dernières. Vu la constance avec laquelle ce phénomène se retrouve, on pourrait le considérer comme spécial à cet empoisonnement.

Cependant, selon plusieurs travaux scientifiques, ce phénomène est très fréquent et se rencontre dans certaines infectious et dans les maladies fonctionnelles et organiques des centres nerveux. Il ne serait, sans doute, que l'indice de l'épuisement fonctionnel des cellules nerveuses. soit par l'effet de la toxine sur la cellule nerveuse, soit par toute autre cause.

En effet, grâce aux travaux de Marinesco, Valenza, Pugnat, Rispal, Anglade, Franca et Athias, il faut reconnaître que les cellules rondes migratrices prennent part à la destruction des cellules nerveuses, dès que ces cellules sont altérées par quelque agent nocif ou tout simplement par la vieillesse (Pugnat).

Ce trouble est manifesté histologiquement par l'accumulation

des cellules migratrices autour des cellules nerveuses, et leur pénétration dans le protoplasma de ces dernières.

Marinesco (17) a étudié ce phénomène dans l'empoisonnement des animaux par la toxine du Botulisme, Valenza(18) dans la cautérisation du cerveau, Rispal (19) dans la chorée, Anglade (20) dans l'éclampsie, Franca et Athias (21) dans l'épilepsie et la démence paralytique.

Enfin beaucoup d'auteurs ont constaté ce fait à l'examen du cerveau d'hommes morts de différentes maladies sans l'expliquer.

Ainsi Z. Popoff (22) a observé dans la fièvre typhoïde la pénétration des leucocytes dans les cellules nerveuses, N. Popoff (23) dans le choléra, Joukovsky (24) dans le délire aigu, Turner (25) dans les maladies diffuses mentales, Matchhenko (26) dans la démence secondaire.

L'origine de ces éléments migrateurs est encore douteuse ; ce qui ne l'est pas, c'est leur rôle dans la destruction des cellules nerveuses dès que celles-ci ont subi l'effet de quelque agent nuisible.

Par conséquent l'accumulation des cellules rondes migratrices autour des cellules nerveuses, et leur pénétration dans le protoplasma de ces dernières doit être considérée comme une marque de la diminution de la résistance de la cellule nerveuse sous l'influence de la toxine tétanique.

Tout en admettant cette explication de ce phénomène, nous avons à répondre encore aux questions suivantes :

1) Les cellules rondes migratrices sont-elles réellement destructrices de la cellule nerveuse ?

2) Détruisent-elles seulement les cellules nerveuses déjà mortes, ou bien aussi celles qui ne sont qu'affaiblies ?

3) Ce phénomène ne dépend-il pas, dans nos expériences, de l'influence de la vieillesse, ainsi que le suppose Pugnat, et non de l'action de la toxine ?

En faveur du rôle actif des cellules migratrices est ce fait, que la pénétration de ces éléments dans le protoplasma des cellules nerveuses a lieu surtout alors que l'animal est empoisonné par une faible dose de toxine, contre laquelle il peut lutter, et au moment où les modifications des cellules sont insignifiantes.

Par conséquent, il y a une disproportion entre l'altération des cellules nerveuses d'une part, et l'accumulation des cellules migratrices de l'autre, ce qui prouverait le rôle actif de ces dernières, et démontrerait qu'elles attaquent non seulement les cellules mortes, mais aussi celles qui ne sont qu'affaiblies. On voit quelquefois des migratrices pénétrer dans des cellules qui, à l'examen histologique, ne présentent aucune modification.

Quant à la troisième question, on peut y répondre presque avec certitude que c'est sous l'influence de la toxine, et non de l'âge de l'animal, que les modifications se produisent, car elles sont aussi manifestes chez les cobayes nouveau-nés empoisonnés par la toxine que chez les vieux.

Ce phénomène trouve son explication dans la théorie sur la destruction des cellules dans l'organisme animal, récemment énoncée dans ces *Annales* (27) par M. le professeur Metchnikoff. D'après cette théorie, les cellules migratrices mononucléaires, les macrophages, deviennent destructrices des éléments nobles, dès que la force vitale de ces derniers est affaiblie par quelque agent nuisible.

D'accord avec cette théorie et d'après ce que nous avons déjà cité plus haut, nous devons considérer l'accumulation des cellules mononucléaires migratrices autour des cellules nerveuses, comme une manifestation de la phagocytose du tissu nerveux, et ces éléments migrateurs comme des macrophages dont le rôle est de détruire la cellule nerveuse tuée ou seulement affaiblie par la toxine tétanique.

Conclusions.

1) Dans l'empoisonnement par la toxine tétanique, on constate des modifications dans les cellules nerveuses de la moelle, et à un certain degré dans celles de l'encéphale. Ces modifications, qui concernent la substance chromatophile et le noyau, sont caractérisées par leur variabilité, leur inconstance et leur variation d'un cas à l'autre : c'est pourquoi on ne peut pas les considérer comme spéciales à cet empoisonnement.

2) Cependant il existe un fait, qui se rencontre le plus souvent, c'est l'accumulation des cellules migratrices mononucléaires autour des cellules nerveuses, et leur pénétration dans le protoplasma de ces dernières. Ce phénomène se produit chez les ani-

maux, surtout dans le groupe antérieur des cellules des cornes antérieures et autour du canal central. Il se manifeste avec le plus d'intensité dans les intoxications chroniques.

3) Ce phénomène doit être considéré comme l'expression de la phagocytose mononucléaire du tissu nerveux. Cette phagocytose se développe sous l'influence de la toxine sur la cellule nerveuse et sert de signe de mort ou tout au moins d'affaiblissement des éléments nerveux sous l'influence du virus.

En terminant, je m'empresse d'exprimer ma profonde reconnaissance à M. le professeur Metchnikoff pour m'avoir permis de travailler en son laboratoire et pour ses précieux conseils.

BIBLIOGRAPHIE ET NOTES

1) Beck, *Neurologiches Centralblatt*, 1894.

2) Nissl, *Centralblatt f. Nervenheil*, 1896.

3) Marinesco, *Société de Biologie*, 1896. — *Congrès de Moscou*, 1897.

4) Goldscheider et Flatau, *Congrès international de médecine*, Moscou, 26 août 1897. — *Fort. der Medicin*, 1897. N. 316. — *Normale und Pathologische Anatomie der nervenzellen auf Grund der nerven Forchungen*. Berlin, 1898.

5) Hunter, *Brit. medic. journ.*, 1897.

6) Claude, *Presse medicale*, 1897, CCLXXVIII.

7) Chantemesse et Marinesco, *Presse médicale*, nº 19, 1898.

8) Matthis, *Deutsche Zeitschrift f. Nervenheilkunde*, 1898, Bd 13, H. 5 et 6.

9) Donetti, *Revue neurologique*, 1898.

10) Pechoutre, *Société de Biologie*, 1898, page 174. — *Thèse de Paris*.

11) Rispal, *Congrès à Montpellier*, du 12 au 17 avril 1838. — *Revue neurologique*, 1898, page 381.

12) Nageotte et Etlinger, *Société de Biologie*, 1898. — *Presse médicale*, 1898.

13) Courmont, Doyon et Paviat, *Archives de Physiologie*, t. X, pages 154 et 472.

14) Buck Moor, *Bull. de l'Académie de médecine de Belgique*, 1899.

15) J'ai observé 4 cas de tétanos chronique. Les autres observations m'ont été communiquées par le Dr Maikoff, qui intoxiquait les animaux par des faibles doses de toxine tétanique.

16) La relation détaillée clinique de ce cas fera l'objet d'une communication que présentera M. Crauson, interne de M. le professeur Marie.

17) Marinesco, *Société de Biologie*, 1896, page 382.

18) Valcuza, *Société de Biologie*, 1896, page 1135.

19) Rispal, *Congrès des médecins aliénistes et neurologistes*, Marseille, avril 1899. — *Revue de Psychiatrie*, 1899, nº 55.

20) Anglade, Mêmes recueils.

21) Franca et Athias, *Société de Biologie*, 1899.

22) L. Popoff, *Des changements dans le cerveau dans la fièvre typhoïde et le typhus*. Varsovie, 1882.

23) N. Popoff. *Les changements pathologiques du système nerveux central dans le choléra asiatique*. Varsovie, 1893.

24) Joukovsky, Les changements pathologiques dans le délire aigu. — *Revue de Psychiatrie russe*, 1898, nº 5 .

25) John Turner, *The journal of mental science*, 1898.

26) Matchenko, Des changements pathologiques de l'écorce du cerveau dans la démence secondaire.

27) Etude sur la résorption des cellules. *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1899 nº 10.

EXPLICATION DE LA PLANCHE

(1-2. — Les cellules non altérées des cornes antérieures de la moelle du cobaye.

(3. — Une cellule de la moelle du cobaye entourée de cellules migratrices mononucléaires. La plupart de ces dernières ont pénétré dans le protoplasma de la cellule nerveuse.

(4-5. — Cellules à différents états de la chromatolyse.

(6. — Une cellule du bulbe du cobaye. On voit dans le protoplasma de cette cellule des éléments migrateurs mononucléaires.

(7-8. — Cellules de l'écorce cérébrale de la région motrice de l'homme. On voit une énorme quantité de pigment.

(9. — Corne antérieure de la moelle chez l'homme. On voit les modifications des cellules et l'hyperémie des vaisseaux.

(10-12. — Cellules de la moelle d'un cobaye. On voit l'accumulation de la substance chromatophile autour du nucléole. La protoplasma des cellules est en état de chromatolyse.

DE L'IDENTITÉ DU BACILLE LACTIQUE AÉROGÈNE

ET DU

PNEUMO-BACILLE DE FRIEDLÆNDER

PAR MM. L. GRIMBERT ET G. LEGROS

Le *bacillus lactis aerogenes* (Escherich), agent essentiel de la fermentation spontanée du lait (Flügge), mis en cause dans certaines infections urinaires[1], péritonéales[2] et méningées[3], possède-t-il une individualité propre? Doit-on le considérer comme une espèce distincte du Pneumo-bacille de Friedlænder avec lequel il offre tant de points de ressemblance?

Denys et Martin[4], s'appuyant sur les caractères morphologiques des deux espèces et sur les résultats de l'inoculation aux animaux, concluent notamment à l'identité; d'autre part, les auteurs qui la repoussent ne donnent comme éléments de différenciation que des caractères secondaires ou inconstants.

Nous avons donc pensé qu'il était utile de reprendre la question en complétant l'étude morphologique de ces bacilles par celle de leurs propriétés biochimiques, dans le but d'obtenir de nouveaux caractères soit de différenciation, soit de rapprochement.

Les résultats obtenus pouvaient accessoirement nous permettre une rapide comparaison de nos bacilles aérogènes types avec certaines espèces bactériennes désignées, très inutilement selon nous, sous le nom de paracoli-bacilles : paracoli-bacilles ne donnant pas d'indol — inactifs sur le lactose — immobiles[5].

1. MOREL, *La Cellule*, t. VII, 2, p. 241. WORBURG, *Münch. med. Woch.*, 18 juillet 1899. HEYSE, *Zeitsch. f. Klin. Med.* XXIV, p. 130.
2. FRŒNKEL, *Wien. Klin. Woch.* n° 13, 14, 15. 1891.
3. A. SCHEIB, *Prager Med. Woch.* n° 15, p. 169, 1900.
4. DENYS et MARTIN, *La Cellule*, 1893, p. 261.
5. GILBERT et LION, *C. R. Société de Biologie*, 18 mars 1893, et *Traité de médecine*, 1895, t. I, p. 626.

Nos recherches ont porté sur quatre bacilles lactiques aérogènes d'origines distinctes. L'un, dû à l'obligeance de M. Kayser, est le ferment *f* de ses travaux sur la fermentation lactique[1], il provenait du laboratoire de Nencki. Les trois autres avaient été isolés de fermentations lactiques spontanées.

Nous avons suivi dans l'étude de ces bacilles la marche proposée par l'un de nous dans les *Archives de Parasitologie*[2], et qui lui avait déjà servi dans son travail sur le Pneumo-bacille de Friedlænder.

Disons de suite que nos trois bacilles lactiques, ainsi que le bacille *f* de Kayser, nous ont donné dans chaque épreuve les mêmes résultats. Les seules différences qu'on pouvait constater étaient des différences d'intensité. Par conséquent, nous ne les décrirons pas séparément, afin d'éviter des redites inutiles.

A. — Biologie générale et morphologie

Nos bacilles lactiques examinés en goutte pendante, sans coloration, sont immobiles.

Fréquemment les éléments d'une même culture sont polymorphes : on les rencontre souvent groupés par deux, placés bout à bout.

Ils prennent facilement les couleurs d'aniline, et se présentent alors sous l'aspect de bacilles courts à bouts arrondis, d'une longueur de 1 μ 5 à 2 μ, et un peu plus longs que larges.

Ils ne se colorent pas par la méthode de Gram.

Les essais de coloration de la spore, même après cultures sur le lait on sur milieu lactosé, n'ont donné aucun résultat.

Dans les milieux de culture usuels, on ne trouve pas de capsules proprement dites ; nous les avons mises au contraire en évidence d'une manière à peu près constante dans le pus, le sang et les sérosités des animaux inoculés.

Ils sont anaérobies facultatifs.

La température optima de leur culture sur bouillon est voisine de 38°. Ils ne résistent pas à un séjour d'un quart d'heure à 60°.

1. Kayser, ces *Annales*, t. VIII, p. 737, 1894.
2. L. Grimbert, De l'unification des méthodes de culture en bactériologie. *Archives de Parasitologie*, t. I, p. 191, 1898.

B. — CULTURES SUR MILIEUX USUELS

1° *Bouillon peptonisé.* — A 37°,5, on obtient un trouble uniforme en deux heures avec une espèce, en 4 heures avec une autre. Après 24 heures, apparaît un léger voile formant un anneau muqueux adhérent aux parois du tube. Quelques amas floconneux se déposent. Quand le voile se détache, il ne se renouvelle pas.

Le bouillon s'acidifie nettement. Il ne donne pas d'odeur appréciable.

2° *Sur gélatine en plaques.* — On observe à 20° au bout de 48 à 60 heures des colonies superficielles punctiformes, transparentes au début, et qui s'accroissent en montrant un point central opaque; finalement elles deviennent saillantes et arrondies, formant de véritales perles blanches à reflets de porcelaine. Plus tardivement encore, la perle s'entoure parfois d'un disque blanchâtre, opaque, régulièrement arrondi, sur lequel elle reste saillante.

3° *Sur gélatine en piqûre et en stries.* — On obtient en une semaine un clou à tête large, plus souvent aplati que convexe.

Le long de la piqûre, les colonies restent isolées en grains blancs sphériques. Souvent des bulles gazeuses, qui semblent traversées par la tige du clou, se développent dans l'épaisseur de la gélatine. Leur production varie avec la teneur naturelle en glucose du bouillon employé. L'adjonction à la gélatine de très faibles quantités de glucose donne lieu, quelques jours après l'ensemencement en profondeur, à de véritables projections en masse de la gélatine.

En strie, le bacille aérogène donne une bande blanchâtre humide à contours festonnés, peu transparente. Nous avons vérifié la modification possible de ces caractères d'opacité après passages sur milieux lactosés [1].

Dans aucun cas, la gélatine n'est liquéfiée.

4° *Sur gélose.* — Strie blanchâtre, opaque, luisante, très visqueuse, à aspect de « colle d'amidon cuit très fluide [2] » coulant plus ou moins au fond du tube. La viscosité, assez nette dans les cultures sur bouillon et sur gélatine, est ici telle que l'anse de platine peut étirer des filaments de 15 à 20 centimètres de longueur.

Le développement sur gélose est rapide. A 37°,5, la culture devient appréciable au bout de 3 à 5 heures.

5° *Sérum de bœuf et sérum humain solidifiés.* — Colonies d'un blanc grisâtre, sans caractères spéciaux, assez visqueuses.

6° *Pommes de terre.* — En 24 heures, se forme un enduit grisâtre ou café au lait clair qui augmente peu à peu, se fonce, se mamelonne et donne enfin de très nombreuses et très volumineuses bulles de gaz sur toute sa surface. Cette production gazeuse atteint son maximum en 4 ou 5 jours puis disparaît après 8 à 10 jours.

1. KROGIUS, *Archives de médecine expérimentale*, janvier 1892. — ACHARD et RENAULT, *C. R. Société de Biologie*, 9 avril 1892.

2. JOSSERAND et BONNET, *Archives de médecine expérimentale*, t. XI, p. 570

C. — Action sur les matières azotées.

1° *Peptone.* — Nous avons donné le plus grand soin à l'étude de l'action de nos bactéries sur la peptone. La production d'indol par les bactéries du groupe B. coli est une des réactions les plus caractéristiques de ce groupe, *quand on sait la mettre en évidence.* Malheureusement, un grand nombre de savants semblent ignorer les conditions sévères de réussite imposées autrefois par Péré [1]. L'ensemencement dans le bouillon peptoné n'est pas une épreuve suffisante, car la présence du bouillon gêne considérablement la production de l'indol quand elle ne l'empêche pas tout à fait. La nature de la peptone n'est pas non plus indifférente. Il n'est pas jusqu'à la dose de nitrite à ajouter qui n'ait son importance.

Si l'on a soin d'opérer sur de simples solutions aqueuses de peptone (peptone Collas, Catillon, Chassaing, etc.) préalablement éprouvées avec un Coli type, on aura entre les mains un réactif des plus sensibles permettant de différencier les bactéries du groupe Coli de celles du groupe Friedlænder, que certains auteurs, entre autres Wilde [2], voudraient réunir en une seule famille.

Nous avons donc ensemencé nos bactéries dans des solutions de peptone Collas à 3 0/0, et nous n'avons jamais constaté la formation d'une trace d'indol.

2° *Albumine cuite :* n'est pas modifiée.

3° *Lait.* — D'après Wilde [2] et Flügge [3], le pneumo-bacille de Friedlænder se distinguerait du bacille lactique aérogène en ce qu'il ne coagule pas le lait. Mais Denys et Martin [4] ont montré que les cultures du B. de Friedlænder, qui ne coagulent pas le lait, acquièrent cette propriété par des passages successifs dans ce milieu.

Tous nos bacilles aérogènes ont coagulé le lait en un temps variant de 48 heures à 5 jours. Le caillot de caséine rétracté n'est pas modifié ultérieurement. La réaction du sérum est for-

1. Péré, ces *Annales*, t. VII, p. 512, 1892.

2. Max Wilde, Ueber den Bacillus pneumoniæ Friedlænder's und verwandte Bakterien. *Centralblatt F. Bakt.*, t. XX, p. 681, 1896.

3. Flugge, *Die Mikroorganismen*.

4. Denys et Martin, *La Cellule*, t. IX, p. 268, 1893.

tement acide. On observe un dégagement gazeux d'intensité variable qui s'exagère par addition de carbonate de chaux. Par conséquent, la coagulation a eu lieu par acidification.

4° *Nitrates.* — Quand on met une bactérie en présence de nitrates, trois cas peuvent se présenter : 1° le nitrate est décomposé avec dégagement gazeux : *a*) avec formation de nitrite; *b*) sans formation de nitrite.

2° Le nitrate est réduit en nitrite sans dégagement gazeux;

3° Le nitrate n'est pas attaqué.

Mais l'un de nous[1] a montré que ces réactions étaient sous la dépendance de la nature du milieu employé, et qu'il fallait établir une distinction entre les microbes qui font fermenter les nitrates en solution peptonée et ceux qui n'opèrent cette destruction qu'en présence des matériaux amidés du bouillon.

Les premiers, que nous nommerons *ferments directs*, ont pour type le B. pyocyanique; les seconds, *ferments indirects*, sont représentés par le B. Coli et le B. d'Eberth. On trouvera dans le mémoire cité l'explication du mode d'action de ces deux catégories.

Lorsqu'on ensemence le pneumo-bacille de Friedlænder ainsi que nos bacilles aérogènes dans une solution de peptone à 1 0/0, additionnée de 1 0/0 de nitrate de potasse pur, on ne constate aucun dégagement gazeux, mais le nitrate est réduit en partie à l'état de nitrite. Il n'en est plus de même quand on remplace la solution de peptone par du bouillon. En culture anaérobie, une véritable fermentation a lieu, et l'on peut constater que les gaz recueillis sont formés d'azote et d'acide carbonique.

Le pneumo-bacille de Friedlænder et nos bacilles aérogènes se conduisent donc comme des ferments dénitrifiants indirects.

Enfin, et pour terminer cette longue série d'épreuves, nous avons constaté, comme l'a vu Balistreri[2], que nos bacilles aérogènes donnaient de l'hydrogène sulfuré quand on les ensemençait dans du bouillon peptoné additionné de soufre libre.

Tous les caractères que nous venons de décrire sont communs à nos bacilles et au bacille de Friedlænder. Ils seraient

1. L. Grimbert, Action du B. coli et du B. d'Eberth sur les nitrates. Ces *Annales*, t. XIII, p. 67, 1899.
2. St. Balistreri, *Il Morgagni*, avril 1894.

déjà suffisants pour conclure à une identification complète, mais nous avons voulu pousser plus loin la comparaison en étudiant leur action sur les hydrates de carbone.

Cette étude était d'autant plus nécessaire qu'il est reconnu, après les travaux de Frankland[1] et de l'un de nous[2], qu'il existe au moins deux races de pneumo-bacilles morphologiquement semblables, mais possédant une action fermentative fort différente sur les hydrates de carbone.

La race de Frankland est sans action sur la glycérine et la dulcite et ne donne pas d'acide lactique avec les autres sucres, mais seulement de l'alcool éthylique, de l'acide acétique et de l'acide formique; tandis que la seconde attaque la glycérine et la dulcite et donne, soit de l'acide lactique gauche, soit de l'acide succinique, soit un mélange des deux, suivant la nature de l'hydrate de carbone consommé.

Cette dernière race comporte une variété possédant l'ensemble de ces propriétés fermentatives avec cette particularité qu'elle n'attaque pas la dulcite[3], variété dont l'existence a été confirmée par Nicolle et Hébert, qui l'ont retrouvée dans un grand nombre d'angines[4] et aussi dans un échantillon de vase de la Seine.

D. — Action sur les hydrates de carbone.

Nos bacilles aérogènes ont été ensemencés dans des tubes à essai renfermant les solutions suivantes additionnées de peptone et de carbonate de chaux : glucose, lactose, saccharose, dextrine, mannite, dulcite et glycérine.

Tous les sucres ont fermenté, *sauf la dulcite*.

Il était intéressant de pousser plus loin l'expérience, et de voir si les produits formés dans ces fermentations étaient identiques à ceux que nous avait donnés autrefois le bacille de Friedlænder dans les mêmes conditions.

Nous avons donc préparé une série de ballons renfermant 500 c. c. d'une solution sucrée à 3 0/0, additionnée de 2 0/0 de peptone et d'une quantité de carbonate de chaux suffisante pour neutraliser les acides formés. Après stérilisation et ensemence-

1. P. Frankland, *Journal of chemical Society*, t. LIX, p. 253, 1891.
2. L. Grimbert, ces *Annales*, t. IX, p. 840, 1895.
3. L. Grimbert, ces *Annales*, t. X, p. 708, 1896.
4. Charles Nicolle et A. Hébert, ces *Annales*, t. XI, p. 67, 1897.

ment, ces ballons étaient examinés au bout de 15 jours environ.

Nous ne reproduirons pas ici la technique employée pour l'analyse qualitative et quantitative des produits de la fermentation, elle est identique à celle que nous avons suivie dans nos recherches antérieures sur le pneumo-bacille de Friedlænder.

Nos bacilles aérogènes donnent avec les hydrates de carbone, de l'alcool éthylique, de l'acide acétique, de l'acide lactique gauche et de l'acide succinique, et de même que le pneumo-bacille de Friedlænder, ils semblent faire un choix entre les divers sucres offerts à leur activité. C'est ainsi que le glucose, la mannite et la glycérine ne donnent pas ou ne donnent que des traces d'acide succinique avec des quantités notables d'acide lactique gauche, tandis que la dextrine, au contraire, ne donne que de l'acide succinique à l'exclusion de l'acide lactique, et que le saccharose et le lactose donnent à la fois de l'acide succinique et de l'acide lactique. L'acide acétique se rencontre dans toutes les fermentations, ainsi que l'alcool éthylique, mais, pour ce dernier, les quantités formées varient avec la nature du corps fermentescible.

Voici les chiffres que nous avons obtenus avec un *B. aerogenes* isolé d'une fermentation spontanée du lait que nous désignerons par la lettre L, et avec l'échantillon d'aérogène type qui nous a été remis par M. Kayser. Ils se rapportent à 100 grammes de substance.

La durée de la fermentation a été en moyenne de 15 jours.

BACILLE L

	Alcool éthylique.	Acide acétique.	Acide lactique gauche.	Acide succinique.
Glucose........	4,00	5,53	46,90	Traces.
Lactose........	11,40	7,70	+	+
Saccharose....	10,00	9,23	+	+
Mannite.......	26,66	4,03	54,33	Traces.
Glycérine......	23,33	4,36	20,23	0
Dextrine.......	3,80	6,46	0	9,03

BACILLE KAYSER

	Alcool éthylique.	Acide acétique.	Acide lactique gauche.	Acide succinique.
Saccharose.....	13,33	5,76	+	+
Mannite........	33,00	7,63	29,86	Traces.
Dextrine.......	6,66	9,70	0	16,06

Ces chiffres sont donnés à titre de renseignement et ne sauraient servir de base à des comparaisons trop étroites.

On sait, en effet, que l'équation d'une fermentation varie à chaque instant sous l'influence de facteurs parmi lesquels l'âge et l'éducation de la semence jouent le principal rôle ; on ne saurait donc espérer avoir des chiffres absolument identiques en employant des semences d'origine différente, mais ce sur quoi on est en droit de compter, c'est sur des réactions de même ordre. Or, nous voyons ici que les fonctions biologiques manifestées par nos bacilles aérogènes sont identiques à celles du pneumobacille de Friedlænder étudié autrefois par l'un de nous. Dès lors tombent toutes les barrières qu'on a voulu élever entre les deux organismes, et à moins de vouloir s'appuyer sur des caractères sans valeur comme la teinte plus ou moins foncée que prennent certaines cultures sur gélatine, on est bien forcé de reconnaître que le bacille décrit sous le nom de bacille lactique aérogène n'est autre chose que le pneumo-bacille de Friedlænder et que tous deux n'ont droit qu'à un nom unique. Bien entendu l'espèce Friedlænder peut comporter un certain nombre de variétés ; l'absence d'action sur la dulcite des bacilles que nous avons étudiée en est une preuve, mais ces variétés, sous la dépendance de l'éducation de la semence, présentent un ensemble de propriétés communes suffisamment nettes pour permettre de les réunir en un groupe unique dont les caractères sont :

1° L'immobilité; 2° la présence des capsules dans le sang des animaux inoculés; 3° la non-liquéfaction de la gélatine; 4° la non-production d'indol; 5° l'action énergique sur les hydrates de carbone donnant naissance à de l'alcool éthylique, à de l'acide acétique, et, suivant la nature des sucres, à de l'acide lactique ou à de l'acide succinique, ou bien encore à un mélange des deux.

On pourra nous faire observer que les bacilles du groupe Coli présentent certaines de ces réactions, notamment l'action sur les hydrates de carbone, mais ils se distingueront toujours des bacilles du groupe Friedlænder : 1° par leur mobilité (encore qu'elle soit variable); 2° par l'absence de capsule dans le sang des animaux inoculés ; 3° et surtout par la production d'indol dans les solutions de peptone.

LES VACCINATIONS ANTIRABIQUES A L'INSTITUT PASTEUR EN 1899

PAR M. E. VIALA
Attaché au service antirabique.

I

Pendant l'année 1899, 1,614 personnes ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur : 10 sont mortes de la rage ; chez 4 d'elles, la mort est survenue moins de quinze jours après la fin du traitement[1]. Deux personnes ont été prises de rage au cours du traitement, elles ne seront pas comptées parmi les traitées.

La statistique s'établit donc ainsi :

Personnes traitées	1,614
Morts	4
Mortalité 0/0	0,25

Dans le tableau suivant, ces chiffres se sont rapprochés de ceux fournis par les statistiques des années précédentes.

Années.	Personnes traitées.	Morts.	Mortalité 0/0.
1886	2671	25	0,94
1887	1770	14	0,79
1888	1622	9	0,55
1889	1830	7	0,38
1890	1540	5	0,32
1891	1559	4	0,25
1892	1790	4	0,22
1893	1648	6	0,36
1894	1387	7	0,50
1895	1520	5	0,33
1896	1308	4	0,30
1897	1521	6	0,39
1898	1465	3	0,20
1899	1614	4	0,25

1. D'après les expériences faites sur les chiens, on est autorisé à penser que les centres nerveux des personnes mortes de rage dans les 15 jours qui suivent le traitement ont été envahis par le virus rabique avant que la cure ait pu avoir toute son efficacité.

II

Les personnes traitées à l'Institut Pasteur sont divisées en trois catégories correspondant aux tableaux suivants :

Tableau A. — La rage de l'animal mordeur a été expérimentalement constatée par le développement de la maladie chez des animaux mordus par lui ou inoculés avec son bulbe.

Tableau B. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

Tableau C. — L'animal mordeur est suspect de rage.

Nous donnons ci-après la répartition, entre ces catégories, des personnes traitées en 1899.

	MORSURES A LA TÊTE			MORSURES AUX MAINS			MORSURES AUX MEMBRES			TOTAUX		
	Traités	Morts	Mortalité	Traités	Morts	Mortalité	Traités	Morts	Mortalité	Traités	Morts	Mortalité
Tableau A.	13	0	0	104	2	1,94	35	0	0	152	2	1,31
Tableau B.	142	1	0,70	664	0	0	293	1	0,34	1.099	2	0,18
Tableau C.	33	0	0	194	0	0	136	0	0	363	0	0
	188	1	0,53	962	2	0,20	464	1	0,23	1.614	4	0,25

III

Au point de vue de leur nationalité, les 1,614 personnes traitées se répartissent de la façon suivante :

Angleterre	12	Hollande	2
Belgique	15	Indes anglaises	62
Espagne	2	Maroc	1
Grèce	4	Suisse	7
Gibraltar	1	Turquie	2

Soit 108 étrangers et 1.506 Français

Voici la répartition par départements des 1,506 Français. Il ne faut pas oublier, dans la comparaison avec les tableaux antérieurs, que quatre instituts antirabiques fonctionnent aujourd'hui qui n'existaient pas autrefois. Lille, Marseille, Montpellier. Lyon drainent les mordus de la région environnante.

Ain	32	Loire-Inférieure	2
Aisne	10	Loiret	3
Allier	8	Lot	20
Alpes (Basses-)	0	Lot-et-Garonne	32
Alpes (Hautes-)	0	Lozère	3
Alpes-Maritimes	1	Maine-et-Loire	8
Alger	0	Manche	3
Ardèche	2	Marne	2
Ardennes	0	Marne (Haute-)	0
Ariège	7	Mayenne	0
Aube	0	Meurthe-et-Moselle	3
Aude	0	Meuse	1
Aveyron	21	Morbihan	6
Bouches-du-Rhône	0	Nièvre	8
Calvados	5	Nord	4
Cantal	46	Oise	8
Charente	4	Oran	0
Charente-Inférieure	6	Orne	6
Cher	3	Pas-de-Calais	0
Constantine	0	Puy-de-Dôme	15
Corrèze	13	Pyrénées (Basses-)	19
Corse	0	Pyrénées (Hautes-)	12
Côte-d'Or	2	Pyrénées Orientales	1
Côtes-du-Nord	7	Rhin (Haut-)	0
Creuse	2	Rhône	236
Dordogne	16	Saône (Haute-)	0
Doubs	20	Saône-et-Loire	15
Drôme	3	Sarthe	16
Eure	6	Savoie	2
Eure-et-Loir	4	Savoie (Haute-)	0
Finistère	4	Seine	468
Gard	0	Seine-et-Marne	10
Garonne (Haute-)	18	Seine-et-Oise	82
Gers	21	Seine-Inférieure	18
Gironde	33	Sèvres (Deux-)	8
Hérault	0	Somme	15
Ille-et-Vilaine	23	Tarn	2
Indre	0	Tarn-et-Garonne	36
Indre-et-Loire	0	Var	0
Isère	40	Vaucluse	2
Jura	19	Vendée	6
Landes	13	Vienne	1
Loir-et-Cher	0	Vienne (Haute-)	0
Loire	51	Vosges	0
Loire (Haute-)	13	Yonne	2

Personnes prises de rage en cours de traitement.

TURPIN, Emile, 7 ans, chez ses parents, rue du Moutier, 70, à Aubervilliers, Seine. Mordu le 9 février, au nez, partie moyenne, deux morsures pénétrantes, et à la jambe gauche quatre autres morsures pénétrantes, par un chien reconnu enragé, du vivant de l'animal et à l'autopsie, par M. Coret, médecin-vétérinaire à Aubervilliers ; ce chien avait mordu sept autres personnes qui ont subi le traitement antirabique et qui se portent bien.

Turpin a été traité à l'Institut Pasteur du 15 février au 3 mars : les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui le 3 mars; il est mort le 7 mars à l'Hôpital des Enfants.

Martin, Emile, 5 ans 1/2, chez ses parents, cultivateurs à Rozet-Fluant, Doubs. Mordu le 22 octobre, au front côté droit, trois morsures profondes qui ont beaucoup saigné, et aux deux paupières supérieures, deux autres morsures pénétrantes, par un chien déclaré enragé par M. Tondeur, vétérinaire à Dôle (Jura). Les blessures n'avaient pas été cautérisées.

Martin a été traité à l'Institut Pasteur du 27 octobre au 14 novembre : les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui le 14 novembre; il est mort le 18 novembre à l'Hôpital des Enfants.

Personnes traitées, mortes de la rage moins de 15 *jours après la fin du traitement.*

Mestre, Aimé, 34 ans, marchand de vins, rue de Picpus, 126, Paris. Mordu le 7 juin, à l'avant-bras droit, trois morsures pénétrantes qui ont été cautérisées avec un liquide 3/4 d'heure après, bras nu, par son chien déclaré enragé par le vétérinaire de la fourrière.

Mestre a été traité à l'Institut Pasteur du 9 juin au 26 juin : les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui le 5 juillet, il est mort le 7 juillet.

Mestre, Charles, 5 ans, fils de Mestre ci-dessus, rue de Picpus, 126. Mordu le 7 juin, par le même chien sur le sourcil droit, trois morsures pénétrantes, et en arrière de ces trois morsures et empiétant sur la région temporale, une autre morsure très profonde longue de 3 centimètres : ces blessures qui ont saigné beaucoup n'ont pas été cautérisées, elles ont été lavées seulement.

Traité à l'Institut Pasteur du 9 juin au 29 juin : les premiers symptômes rabiques se sont manifestés le 5 juillet; mort le 8 juillet.

Thevenet, Jean-Baptiste, 11 ans, chez ses parents, vignerons à Fleurie (Rhône). Mordu le 6 juillet, à la main droite, au niveau de la 3e phalange de l'index, deux morsures pénétrantes, avec véritable perte de substance de 1 centimètre, par un chien dont M. le docteur Bec, de Fleurie, affirme la rage. Les blessures avaient été cautérisées à l'arnica 10 minutes après.

Le même chien a mordu deux autres personnes qui ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur et qui se portent bien.

Thevenet a été traité à l'Institut Pasteur du 9 au 26 juillet : les premiers symptômes rabiques se sont manifesté chez lui le 28 juillet; il est mort le 30 juillet.

Choulot, Berthe, 19 ans, cultivatrice à Parcey (Jura). Mordue le 30 août, sur l'aile droite du nez, une morsure pénétrante qui a saigné, par un chien errant, inconnu dans le pays, et qui a mordu un grand nombre de chiens et des porcs. M. Tondeur, vétérinaire à Dôle, nous écrit que deux des chiens mordus en même temps que Mlle Choulot sont devenus enragés, l'un le 7 septembre et l'autre le 8 octobre.

La morsure de Mlle Choulot n'a pas été cautérisée.

Traitée à l'Institut Pasteur du 5 au 25 septembre, les premiers symp-

tômes rabiques se sont manifestés chez elle le 5 octobre, elle est morte le 7 octobre à l'hôpital de Dôle.

Personnes traitées, mortes de rage après le traitement.

LAPOUBLE, Jeanne, 10 ans, chez son père, charpentier à Cagnottes (Landes). Mordue le 29 juillet, à la main droite, face dorsale, deux morsures pénétrantes qui ont saigné, par un chien déclaré après autopsie comme suspect de rage par M. Noguiès, vétérinaire à Cagnotte.

(Nous avons su depuis qu'un âne mordu par ce même chien était devenu enragé le 26 septembre.)

Les blessures de la jeune Lapouble ont été lavées seulement à l'eau phéniquée 2 heures après.

Traitée à l'Institut Pasteur du 31 juillet au 14 août : les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez elle le 13 septembre, elle est morte le 17 septembre.

CHATEAU, Charles, 17 ans, porteur de dépêches, 13, rue du Chemin-Vert, au Parc-Saint-Maur (Seine). Mordu le 2 août à la jambe droite sous le jarret, quatre morsures qui ont saigné, le pantalon avait été déchiré par les dents du chien, qui a été reconnu enragé par un vétérinaire. Les blessures de Château n'avaient pas été cautérisées.

Château a été traité à l'Institut Pasteur du 4 au 19 août : les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui le 30 septembre, il est mort le 2 octobre.

GALARET, Louis, 39 ans, cultivateur à Senaillac (Lot). Mordu le 27 février, main droite, face dorsale, 6 morsures superficielles ; index gauche, 6 autres morsures pénétrantes, et petit doigt gauche, 2 autres morsures pénétrantes, toutes ces morsures ont saigné.

Mordu par un chien dont la tête a été envoyée à l'Institut Pasteur, et dont le bulbe, inoculé le 2 mars à un cobaye, a donné la rage le 7 mai.

Les blessures de Galaret n'ont pas été cautérisées.

Galaret a été traité à l'Institut Pasteur du 2 au 21 mars : les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui dans le courant du mois d'octobre, il est mort vers le 15 octobre, nous n'avons pas eu de renseignements précis sur la date exacte de la mort.

OURLOUT, Louise, 49 ans, ouvrière en chaussures, demeurant à Paris, 7, petite rue des Lilas. Mordue le 13 octobre, à la joue droite, une morsure longue de 1 centimètre qui a saigné, par un chien reconnu enragé par M. Rondel, vétérinaire à Paris. La blessure de Mme Ourlout n'avait pas été cautérisée.

Elle a été traitée à l'Institut Pasteur du 20 octobre au 10 novembre. Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez elle le 2 décembre : elle est morte le 3 à l'hôpital Tenon.

REVUES ET ANALYSES

GLOBULOLYSE ET PRESSION OSMOTIQUE

Par le Dr P. NOLF

REVUE GÉNÉRALE

Les auteurs qui ont étudié la destruction des bactéries dans le sérum des animaux supérieurs ou celle des globules rouges d'une espèce animale dans le sérum d'autres espèces, ont généralement vu dans ces phénomènes des faits de digestion, analogues à celle d'un flocon de fibrine dans une solution de pepsine. En faveur d'une pareille assimilation plaidaient la nature albuminoïde des globules, des bactéries, et l'acte même de leur dissolution, au moins partielle, dans le liquide actif.

D'autre part, les quelques propriétés connues des alexines, leur fragilité si grande vis-à-vis des agents chimiques et physiques, l'action favorisante d'une température de 37° sur les phénomènes de dissolution qu'elles provoquent, les rapprochent aussi des enzymes. Ce rapprochement était d'autant plus facile à prévoir que l'idée que nous nous faisons d'un ferment soluble étant encore très peu précise, nous avons une tendance naturelle à classer, sous la rubrique fermentation, tout phénomène chimique, d'une durée assez longue, où interviennent des albuminoïdes.

Il est très probable cependant que, sous cette étiquette, sont catalogués actuellement des phénomènes d'essence très différente, et dont le seul caractère commun est notre absolue ignorance de ce qui les constitue. Ces comparaisons, où le terme auquel on compare, n'est guère plus connu que le terme comparé, ont donc pour unique résultat de décorer d'un nom le phénomène qu'il s'agirait d'expliquer. Il serait bien plus profitable de chercher, quand cela est possible, des points de comparaison dans des phénomènes plus simples, où des faits analogues se produisent sous l'influence d'agents dont nous connaissons les propriétés. Et dans la question des dissolutions de globules ou de microbes par les sérums, je ne doute en aucune manière que, quelle

que soit d'ailleurs l'essence du phénomène, nous n'ayons plus d'avantage actuellement à le comparer à ce qui se passe, quand la même dissolution se produit sous l'action de l'eau distillée, qu'à l'assimiler à la digestion d'un fragment d'albumine solide dans un ferment peptonisant. Et cela d'autant plus, que les produits de destruction du globule par l'eau ou par l'alexine sont les mêmes : hémoglobine diffusée et stroma résiduel. et que ni l'hémoglobine, ni le stroma ne semblent subir de modification ultérieure. Qu'est-ce alors que cette action fermentative, dont le résultat est la destruction non d'une combinaison chimique, mais d'un simple équilibre osmotique, rompu plus rapidement et plus complètement par l'eau que par le sérum ?

Cette manière d'envisager la question n'est cependant pas celle qui est généralement en honneur. Peut-être faut-il incriminer notre manque de connaissances en ce qui concerne la bactériolyse par les corps chimiques. Il ne peut cependant en être de même pour les globules rouges, qui sont le matériel de choix, dont se sont servis les physiologistes dans leurs expériences sur l'action dissolvante d'un grand nombre de solutions. Comme les résultats des travaux de ces dernières années sur ce sujet sont en complète concordance entre eux et que leur point de vue est totalement différent des opinions admises en bactériologie. j'ai cru utile de rapporter ici leurs données essentielles. Mais qu'il me soit permis, avant de commencer cet exposé, de rappeler quelques notions fondamentales au sujet des pressions osmotiques.

L'étude de ces dernières date de la découverte des cloisons semi-perméables. On connaissait depuis Graham des cloisons (tel le parchemin) qui laissaient passer certaines substances dissoutes à l'exclusion d'autres : celles qui passaient étaient dites cristalloïdes, les autres colloïdes. Traube, et ensuite Pfeffer décrivirent des cloisons qui ne se laissaient plus traverser par la plupart des substances que l'eau dissout, tandis que l'eau même passe librement. Vis-à-vis de pareilles membranes, dites semi-perméables, beaucoup de sels seraient des colloïdes. Or, si dans un vase, dont la paroi est constituée par une de ces cloisons semi-perméables, on verse une solution d'une substance ne passant pas, qu'on adapte sur le vase, fermé hermétiquement, un manomètre et qu'on plonge le tout dans l'eau distillée, le manomètre indiquera bientôt une hausse de la pression intérieure du vase, hausse qui peut devenir énorme. Cette élévation de pression mesure la tension osmotique de la solution qui remplit le vase.

L'expérience démontre que la pression osmotique est proportionnelle au nombre de molécules du corps dissous dans un volume donné de liquide, et les lois qui la régissent sont, comme l'a démontré van t'Hoff, identiques à celles qui m urent la pression des gaz. C'est ce qui a amené van t'Hoff à concevoir l'acte de la solution comme étant

l'évaporation du corps dissous dans un volume donné de liquide. Quand un morceau de sucre fond dans l'eau, les choses se passent comme si les molécules de sucre, subitement libérées de leurs attaches mutuelles, s'élançaient, à la façon de vraies molécules gazeuses, dans l'espace libre qui leur est offert (l'espace du dissolvant), pour le parcourir dans tous les sens et venir exercer par leurs chocs contre l'enveloppe du dissolvant une véritable pression, qui est la pression osmotique. S'il existe un excès de sucre pour la quantité d'eau qui surnage, il se produit bientôt un équilibre correspondant à la saturation du liquide. Cette saturation est l'analogue de la tension de vapeur maxima que donne un liquide qui s'évapore en partie dans un espace vide limité.

D'après cette théorie, toutes les molécules étant équivalentes au point de vue de la pression qu'elles exercent, les solutions équi-moléculaires doivent posséder la même tension osmotique et cette tension doit être égale à la pression exercée par un même nombre de molécules gazeuses occupant le même volume. Or 1 gramme-molécule d'un gaz quelconque occupe à 0° l'espace de 22,4 litres, ou se trouve enfermé à la même température sous une pression de 22,4 atmosphères dans le volume de 1 litre. Cette pression doit donc être celle qu'exercent 342 grammes (poids moléculaire) de sucre dans un litre de solution, d'où, pour une concentration de 1 0/0 de sucre, une pression de 0,655 atmosphères à 0°, et, à 15°, de $0,655\ (1 + 15\ \alpha) = 0,69$ atmosphères. Les mesures directes de Pfeffer à cette température donnèrent des valeurs oscillant entre 0,62 et 0,71.

Des valeurs concordant aussi parfaitement furent trouvées pour une série de substances. D'autres au contraire (et ce sont, comme le fit remarquer Arrhenius, celles dont les solutions conduisent l'électricité) possèdent un pouvoir osmotique supérieur à celui exigé par la théorie. C'est ce qui a amené Arrhenius à reprendre une hypothèse de Clausius, d'après laquelle les molécules des substances conduisant l'électricité en solution aqueuse (électrolytes) étaient en partie dissociées dans la solution. La dissociation aurait pour effet de diviser la molécule en deux ou plusieurs parties appelées *ions*, qui sont des atomes ou des groupes atomiques pourvus d'une charge électrique. Or, d'après Arrhenius, au point de vue de leur valeur osmotique, molécule et ion sont équivalents, et l'on conçoit que si de m molécules, n sont dissociées chacune en deux ions, la pression au lieu d'être proportionnelle à m, le sera à $m + n$ et si le nombre d'ions fournis par une molécule est de 3, 4, le coefficient osmotique deviendra $m + 2n$, $m + 3n$, etc.

Au lieu d'employer, pour la mesure de la pression osmotique, le moyen direct consistant en l'emploi d'un vase à paroi semi-perméable muni d'un manomètre, il est plus simple de déterminer certaines cons-

tantes physiques, telles que la température de congélation de la solution ou son point d'ébullition. L'expérience, conformément aux vues théoriques, a démontré, en effet, qu'il existe entre la valeur de la pression osmotique d'une solution et l'abaissement ou l'élévation de ses températures de congélation ou d'ébullition comparées à celles du dissolvant, des rapports simples permettant de calculer facilement l'une de ces valeurs au moyen des autres.

Ces données, qui ont révolutionné la chimie des solutions, sont destinées à jouer en biologie un rôle toujours plus important, puisque tous les phénomènes de la vie se passent au sein de liquides.

Leur première application à la physiologie des animaux date des travaux de Hamburger. Hamburger fut précédé par un botaniste, son compatriote H. de Vries, qui étudia l'action des solutions salines sur les cellules végétales.

Quand on place dans une solution saline concentrée, mais non vénéneuse pour le protoplasme végétal, quelques cellules épidermiques de la nervure médiane d'une feuille de *Tradescantia discolor*, on voit la couche protoplasmique corticale des cellules se détacher de la paroi cellulosique des logettes qui les contiennent; le corps protoplasmique, ramassé en boule, n'occupant plus qu'une partie de l'espace de ces dernières. Ce phénomène, connu de Naegeli, s'appelait *plasmolyse* des cellules. Si l'on plonge maintenant les cellules plasmolysées dans l'eau pure, elles gonflent rapidement et viennent de nouveau remplir complètement leur logette. Elles sont alors en *turgescence*.

Ce retrait sous l'action de solutions concentrées, cette turgescence dans l'eau pure, se comprennent facilement, si l'on admet que la paroi protoplasmique de la cellule végétale est imperméable pour les sels dissous dans l'eau, perméable au contraire à celle-ci, en un mot, si elle constitue une membrane semi-perméable. D'après les lois de l'osmose, il faut, dans ces conditions, qu'il y ait un courant d'eau à travers la paroi cellulaire, allant de l'endroit où règne la tension osmotique la plus élevée, vers l'endroit de moindre tension. Les liquides contenus à l'intérieur des cellules épidermiques possèdent une pression osmotique bien déterminée, due aux substances qu'ils tiennent en solution. Vient-on à plonger un lambeau épidermique dans une solution saline ou sucrée concentrée, à tension osmotique très élevée, il s'établit aussitôt un courant d'eau de la cellule vers l'extérieur; la cellule perd son eau d'imbibition, elle se ratatine et le phénomène ne s'arrête que lorsque la pression osmotique dans le liquide intra-cellulaire est devenue égale à celle de la solution qui la baigne. C'est ce qui a lieu, quand les deux liquides ont une même concentration moléculaire. Placée au contraire dans l'eau distillée, où la tension osmotique est nulle, la cellule plasmolysée gonfle, parce qu'il s'établit immédia-

tement un courant entraînant l'eau de l'extérieur vers l'intérieur, et comme ici encore le phénomène ne s'arrête que lorsque l'équilibre est établi, la cellule devrait tendre vers un volume infiniment grand. Seulement elle est heureusement bornée dans son expansion par la logette de cellulose qui l'emprisonne, car si nul obstacle ne l'arrêtait, elle éclaterait infailliblement sous la poussée interne qui la distend.

H. de Vries ayant déterminé, pour différents sels, la concentration minima de leurs solutions aqueuses, provoquant encore un début de plasmolyse des cellules de *Tradescantia discolor*, trouva que pour des sels de même constitution chimique, tels que KNO_3, KBr, KCl, NaCl, NaI, etc., cette concentration correspond d'un sel à l'autre à une même teneur en molécules. D'autre part, du fait qu'à cette concentration correspondait la limite inférieure du pouvoir plasmolysant de ces sels, il était en droit de conclure que pour cette teneur en molécules, les solutions des sels précédents possédaient une pression osmotique approximativement égale (très légèrement supérieure) à celle du liquide contenu dans les vacuoles de la cellule. Pour ce motif, de Vries appela ces solutions, des solutions *isotoniques* entre elles et avec le liquide cellulaire. D'autres sels, tels que l'oxalate, le sulfate de potassium, le phosphate bipotassique se montraient également isotoniques entre eux pour des concentrations moléculaires égales, mais la tension d'une solution de l'un d'eux, comparée à celle d'une solution équi-moléculaire d'un sel de la première série, était plus élevée dans le rapport de 4 à 3.

Ayant déterminé la valeur osmotique de la molécule d'un grand nombre de substances et ayant comparé les résultats entre eux, de Vries reconnut que les corps chimiques examinés se réunissaient en groupes de *même pouvoir osmotique moléculaire*, et que, d'un groupe à l'autre, les valeurs moyennes se trouvaient dans des rapports simples. Ce pouvoir osmotique moléculaire, qu'il appela *coefficient isotonique*, étant fait égal à 2 pour le sucre de raisin, celui des sels alcalins des acides monobasiques était 3, celui des sels alcalins des acides bibasiques, 4, etc.

Quand Hamburger[1] voulut étudier au même point de vue l'action des solutions salines sur les globules rouges du sang, il dut naturellement renoncer au phénomène-limite, qui avait servi à de Vries, la rétraction cellulaire amenant le décollement entre protoplasme pariétal et cloison cellulosique. Les globules rouges étant des cellules nues, dépourvues de toute coque rigide, un pareil phénomène ne peut se produire. Quand un globule est plongé dans une solution de pouvoir osmotique supérieur au sien propre (solution hyperisotonique), il se ratatine, en expulsant une partie de son eau d'imbibition. Il prend alors l'aspect de boule épineuse, familier aux cliniciens qui le rencontrent dans les urines sanglantes un peu concentrées. Est-il placé au contraire

dans une solution à tension osmotique plus faible que la sienne (solution hypisotonique), le courant d'eau s'établira de l'extérieur vers l'intérieur et le globule gonflera. Il le fera librement, puisque aucune membrane ne l'enserre, et la dilatation ne s'arrêtera que lorsque l'équilibre sera atteint. Mais l'élasticité de la couche protoplasmique pariétale est limitée. On comprend dès lors que, si la tension extérieure est très faible ou nulle (eau distillée), le gonflement globulaire deviendra tel à un moment donné, qu'il y aura éclatement total ou partiel de la paroi globulaire, et le contenu coloré de l'hématie passera dans le liquide ambiant. C'est ce phénomène qui servit à Hamburger de réaction-limite.

Il ajouta de petites quantités du sang de divers animaux à des solutions différemment concentrées de nombreux sels, tels que le nitrate, l'iodure, le bromure, l'acétate, l'oxalate de potassium, le chlorure, le bromure, l'iodure de sodium, le chlorure, les sulfates de magnésium anhydre et hydraté, les chlorures de calcium, de baryum et aussi le sucre de canne. Et il détermina pour chacune de ces substances quelle était la concentration correspondant à un début d'hémolyse.

Hamburger s'adressait à des cellules d'origine et de signification complètement différentes de celles qu'avait observées de Vries, il prenait comme réaction limite un phénomène en apparence absolument distinct, et pourtant les résultats, auxquels il aboutit, furent la reproduction fidèle de ceux de son prédécesseur. A part quelques différences de détail, la concordance était mathématique. Ici encore les substances examinées se montrèrent actives, non en raison de leurs propriétés chimiques, mais en raison de leur concentration moléculaire. Des solutions équimoléculaires de NaCl, NaI, NaBr, KNO_3, etc., agissaient identiquement de même sur les globules. Ici encore se retrouvaient les différences du coefficient isotonique d'un groupe de substances chimiques à l'autre, et les valeurs trouvées étaient celles de de Vries.

Hamburger confirmait ainsi d'une façon éclatante en physiologie animale les résultats acquis en botanique, et montrait la grande portée des phénomènes osmotiques en biologie.

Ayant déterminé, pour le sang de mammifère, la valeur osmotique d'une solution de nitrate de potassium immédiatement supérieure à celle qui détermine un début de globulolyse, Hamburger fit les mêmes mesures pour les globules de sang de poule, de grenouille et de tanche. Soit 1 la valeur osmotique de la solution correspondant au sang de mammifère; pour les oiseaux, elle sera 0,741; pour la tanche, 0,669; pour la grenouille, 0,302.

Cependant ces chiffres n'expriment pas la tension osmotique vraie de l'intérieur du globule, elles donnent la valeur de la tension limite que le globule est capable de supporter sans perdre son hémoglobine. Il fallait donc, pour évaluer la tension osmotique normale du globule,

recourir à un autre procédé. Hamburger[2] s'adressa d'abord à l'examen microscopique, qui décèle les variations d'aspect des globules dans les solutions hyper- ou hypisotoniques. Mais la méthode était peu rigoureuse, les résultats manquaient de netteté.

En même temps, il proposa le moyen indirect consistant à déterminer la quantité d'eau qu'il fallait ajouter à du sérum, pour que celui-ci provoquât un commencement de globulolyse. Pour le sérum de grenouille, il fallait l'addition de 2,5 volumes d'eau à un volume de sérum. Or la solution de NaCl dans laquelle les globules rouges de grenouille commencent à perdre leur hémoglobine étant de 0,21 0/0, on était en droit de dire que le sérum de grenouille avait une tension équivalente à celle d'une solution de chlorure sodique de $\frac{0,21 \times 35}{10} = 0,73$ 0/0. L'examen microscopique lui assignait le titre 0,64 0/0. Par le même procédé, Hamburger arrivait, pour le sérum de bœuf, à une valeur osmotique correspondant à celle d'une solution de chlorure sodique de 1,12 0/0. Il est inutile de dire que cette mesure de la valeur osmotique du *sérum* du sang donnait également celle des *globules*, les deux étant forcément égales.

En 1890[3], la même méthode lui fournissait pour le sérum de cheval une valeur correspondant à celle d'une solution de sucre de canne de 0,71 0/0, ce qui équivaut en NaCl à 0,82 0/0. Ce résultat, assez différent du précédent, n'était pas définitif. Toujours par le même procédé, le même auteur arrivait[4], en 1893, à une valeur de 0,92 0/0 de NaCl pour la pression osmotique du sérum de bœuf. Il existe d'ailleurs des variations assez considérables de celle-ci à l'état normal. En même temps, Hamburger contrôlait par deux autres méthodes les chiffres que lui avait fournis son procédé.

Il répéta d'abord les déterminations, faites en premier lieu par Dreser, du point de congélation du sérum sanguin, d'où l'on tire par le calcul la valeur de sa pression osmotique. La concordance entre les résultats des deux méthodes fut complète. Ensuite il se servit également d'un procédé, proposé par Blix et Hedin en vue d'autres recherches.

Hedin[5] avait employé en 1891 la force centrifuge comme moyen de détermination du volume total des globules rouges d'un sang donné. Il mélangeait le sang à examiner avec un égal volume de liquide de Müller, introduisait le mélange dans des pipettes calibrées, formées d'un tube de verre à paroi épaisse, à lumière étroite, ouvert aux deux bouts. Après introduction du sang par aspiration, les pipettes étaient bouchées au moyen de plaques de caoutchouc et soumises à l'action de la force centrifuge, jusqu'à ce que le volume occupé par les globules fût devenu invariable. Dans ces conditions, le sang à l'état normal donne

un volume globulaire sensiblement constant d'un échantillon à l'autre. La même méthode, appliquée à du sang d'origine pathologique, devait servir, dans l'idée de son inventeur, à la détermination des volumes relatifs de la masse globulaire dans les différents états morbides.

A ce moment, Hedin n'avait eu en aucune manière l'idée d'employer sa méthode à la mesure des pressions osmotiques. Ce fut Hamburger qui lui donna cette destination. Ayant été conduit par ses études antérieures à observer les changements considérables de volume que subissent les globules rouges sous l'influence de solutions salines de concentrations diverses, il eut l'idée, au lieu de mesurer individuellement les globules, de déterminer les variations de leur masse dans ces diverses solutions. Pour cela, il reprit la méthode de Hedin, celle de l'*hématocrite*. Ayant ainsi soumis à la force centrifuge des mélanges de globules dans diverses solutions salines ou sucrées, il constata que pour des liqueurs isotoniques de nature chimique diverse, le volume globulaire est constant, et que d'autre part pour une même substance, le volume globulaire est en raison inverse de la concentration de la solution. Cette nouvelle confirmation était d'autant plus intéressante qu'elle gardait intacts les globules sur lesquels on opère.

Ce fut la même méthode dont se servit exclusivement Hedin, quand il reprit en 1894 ses études sur les volumes globulaires, en se plaçant cette fois-ci au point de vue de la tension osmotique. Ses recherches confirmèrent complètement les résultats de Hamburger et les complètèrent. Hedin fut le premier qui attira l'attention sur la nature des coefficients isotoniques de de Vries et de Hamburger.

Il démontra que ces différentes valeurs de la tension osmotique moléculaire étaient dues à la dissociation partielle des molécules en *ions*, dissociation très forte pour les sels alcalins et alcalino-terreux aux concentrations employées. Or, comme il a été dit, suivant que le nombre d'atomes contenu dans une molécule sera plus ou moins grand, cette dissociation augmentera la tension osmotique dans une proportion plus ou moins forte, et c'est ce qui explique que de Vries et Hamburger, en groupant les sels étudiés suivant leur coefficient isotonique, étaient arrivés à les grouper non d'après leurs propriétés chimiques, mais d'après la valence du métal ou de l'acide.

En étudiant à ce point de vue les coefficients isotoniques trouvés par ses devanciers et ses résultats propres, Hedin put déterminer, par une méthode physiologique, la valeur du coefficient de dissociation pour différents sels, et les chiffres trouvés concordaient en tous points avec ceux établis par différents physiciens, qui les avaient tirés de recherches sur la conductibilité électrique.

Koeppe arrivait d'une façon complètement indépendante aux

mêmes conclusions en 1895, par la méthode de l'hématocrite [7].

D'autres auteurs encore, en s'occupant des mêmes questions ou de sujets attenants, purent confirmer ces faits, et, depuis, aucune voix discordante ne s'est élevée. On peut donc considérer comme un fait acquis que l'action conservatrice ou destructive des solutions salines citées précédemment, découle de leurs propriétés osmotiques, et que la globulolyse qu'elles provoquent, quand elles sont trop diluées, est un phénomène d'ordre exclusivement physique.

Or, à côté de ces substances qui ne deviennent nocives pour les globules rouges que grâce à une concentration trop faible, les physiologistes en connaissaient depuis longtemps d'autres, telles que l'urée, la glycérine, l'éther, le chloroforme, certains sels ammoniacaux, etc., qui détruisent les globules en toutes concentrations, en vertu d'une action qu'on appelait vénéneuse, faute de l'expliquer. Il était du plus haut intérêt de reprendre leur étude à la lumière des travaux précités et de tâcher d'élucider l'essence de cette toxicité. C'est ce qu'entreprit Gryns.

Quelques auteurs avaient déjà constaté que l'action de plusieurs de ces substances vénéneuses pour les globules rouges était empêchée par la présence simultanée de sels non nocifs. C'est ainsi que Hamburger avait trouvé que des quantités suffisantes de nitrate potassique empêchaient l'action dissolvante du chlorure ammonique. Mais aucune explication n'avait été donnée de ce phénomène. Gryns montra d'abord que l'urée provoque la globulolyse en toute concentration. Si à une solution d'urée on ajoute du chlorure sodique en quantité suffisante pour que ce sel possède une tension osmotique égale à celle du sérum, la solution perd toute action nocive sur les globules. Le sel marin n'y agit pas du tout comme antidote spécifique, il peut être remplacé par des quantités *équivalentes au point de vue osmotique* de sucre de canne ou d'un autre sel de potassium ou de sodium. Si, d'autre part, on fait deux séries de dilutions successives d'une solution isotonique de chlorure sodique, en employant dans la première série de l'eau distillée, dans la seconde une solution d'urée, et qu'on ajoute des globules rouges à ces diverses liqueurs, la limite de la globulolyse est exactement la même dans les deux séries. On en arrive ainsi à la conclusion que les solutions d'urée agissent sur les globules rouges à la façon de l'eau distillée pure, et ne sont donc pas un vrai poison protoplasmique. Au point de vue osmotique, on peut concevoir très aisément le phénomène, en admettant que l'enveloppe des globules rouges est perméable à l'urée comme à l'eau. S'il est vrai que les molécules d'urée traversent l'enveloppe du coefficient aussi rapidement que l'eau, la solution d'urée pure pourra posséder n'importe quelle tension osmotique, celle-ci n'existera pas pour le globule qui

s'y comportera comme dans l'eau distillée. La preuve directe de la pénétration de l'urée à l'intérieur des globules n'était pas difficile à faire. Des globules furent mis en suspension dans une solution isotonique de chlorure sodique contenant 10 0/0 d'urée et soumis à la centrifugation. Un dosage d'urée dans le liquide surnageant et dans le dépôt globulaire indiqua la même teneur, ce qui ne se comprend qu'en admettant une répartition égale de l'urée entre le liquide surnageant et les globules. L'auteur put constater de même une pénétration du chlorure ammonique dans les globules.

En employant la même méthode, c'est-à-dire en faisant agir sur les globules, les solutions des diverses substances étudiées dans l'eau pure et dans une solution isotonique de chlorure sodique, Gryns admit (sans plus faire d'analyse directe du liquide et des globules) que toute substance qui dissout les globules en solution aqueuse et est inactive en solution chlorurée, est une substance pénétrante. Au contraire, si la solution aqueuse en concentration isotonique ne provoque pas de globulolyse ou ne la provoque que tardivement et que le chlorure sodique ne l'influence pas, la substance n'est pas pénétrante.

Parmi les résultats les plus intéressants de cette recherche, il faut citer les suivants :

Ayant constaté que la plupart des sels d'ammonium, tels que le chlorure, le bromure, etc., pénètrent les globules, tandis que les sels de potassium ou de sodium des mêmes acides n'entrent pas, Gryns cherche l'explication de ce fait dans l'hypothèse suivante. En solution aqueuse diluée, tous ces sels sont dissociés en leurs ions. Il faut donc, pour que l'un d'eux traverse la paroi globulaire, que celle-ci soit perméable non à sa molécule complète, mais à ses deux ions envisagés isolément. Si deux ions ne pénètrent ni l'un ni l'autre, il n'y aura évidemment pas pénétration de la molécule à laquelle ils appartiennent. Si l'un des deux pénètre à l'exclusion de l'autre, il y aura en réalité pénétration de quelques ions dans les globules, mais en raison de la charge électrique considérable des ions qui ont pénétré, la solution prend une charge électrique de nom contraire, assez forte pour arrêter toute pénétration ultérieure, à un moment où la quantité des ions passés est encore de beaucoup trop faible pour pouvoir être mesurée par pesée. Si donc un ion pénétrant est accouplé dans une molécule à un ion qui ne franchit pas la paroi globulaire, l'action nocive du premier sera empêchée par le second. D'après Gryns, parmi les ions électro-positifs, H_4N^+ est pénétrant à l'encontre de K^+, Na^+ ; parmi les électro-négatifs Cl^-, Br^-, I^-, etc., sont pénétrants, tandis que SO_4^-, NO_3^- ne le sont pas. Cette explication n'est que l'application biologique d'une hypothèse formulée par Ostwald au sujet de la membrane semi-perméable de ferro-cyanure de cuivre. Celle-ci laisse passer le

chlorure de potassium, mais retient le chlorure de baryum et le sulfate de potassium, ce qu'Ostwald explique en déclarant la membrane perméable aux ions K^-, Cl^-, imperméable aux ions Ba^+, $SO_4^=$. Gryns n'envisage que les ions et ne se préoccupe pas des molécules neutres non dissociées qui coexistent en petit nombre à leurs côtés dans les solutions.

En ce qui concerne les solutions très diluées des sels alcalins, où la dissociation en ions est pour ainsi dire complète, il est clair que les propriétés pénétrantes ou non pénétrantes d'un sel doivent être moins fonction de sa molécule que de ses ions. Il en est tout autrement quand la solution saline devient plus concentrée, et, dans le cas du $Am_2 SO_4$ par exemple, il yaurait à considérer, pour une certaine concentration de solution, non plus seulement les ions Am^+ et $SO_4^=$, mais encore les molécules non dissociées $Am_2 SO_4$, dont les propriétés de pénétration sont totalement indépendantes de celles des ions.

Et pour certaines substances dissociées, on ne peut pas *a priori* rejeter l'influence possible de ce troisième élément, même en solution diluée. Que la question ne se limite pas aussi simplement que l'indique l'énoncé de Gryns, c'est d'ailleurs prouvé par le fait que le sulfate ammonique, bien que possédant un ion non pénétrant $SO_4^=$, provoque cependant à la longue de la globulolyse. Il en est de même de $Na_2 CO_3$, dans lequel Na^+ est non pénétrant, $CO_3^=$ pénétrant. Pourquoi $Na_2 CO_3$ produit-il, tardivement il est vrai, une destruction des globules, alors que NaCl ne les altère aucunement? C'est ce que n'expliquent pas jusqu'ici les propriétés des ions. Il faut donc faire ici la part d'autres facteurs, dont la nature et le mode d'action sont encore à déterminer.

En ce qui concerne les substances non dissociées, les alcools mono et triatomiques (glycérine) traversent facilement la paroi globulaire, l'érythrite (alcool tétratomique) y réussit encore, mais lentement, et la mannite (alcool hexatomique) ne le fait plus du tout. Les globules sont perméables aux éthers, aux acides gras et à leurs amides, non aux acides aminés ni aux sucres.

Ces résultats sont extrêmement intéressants à nombre de points de vue. Tout d'abord, ils ramènent à une pure question de physique l'action vénéneuse d'un grand nombre des anciens poisons des globules rouges, et sous ce rapport, ils ouvrent la voie à des recherches similaires en toxicologie, où les conceptions générales ont eu jusqu'aujourd'hui leur source principale dans des considérations tirées de la statique chimique.

D'autre part, comme le fait remarquer Gryns, ils nous montrent que c'est à tort que dans les études physiologiques si nombreuses actuellement, où les questions d'absorption intestinale, de sécrétion rénale, de formation de lymphe, sont étudiées au point de vue des lois

de l'osmose, on considère comme osmotiquement active la masse totale des substances dissoutes dans le liquide examiné. Supposons la paroi intestinale perméable au chlorure sodique. Dans ces conditions, une solution isotonique de ce corps se comportera dans l'intestin comme de l'eau pure. Vis-à-vis d'elle, le plasma sanguin se comportera, non en raison de son pouvoir osmotique absolu, qui est dû en bonne partie à sa teneur en chlorure sodique, mais en raison de la fraction de sa tension osmotique due à des constituants, pour lesquels la paroi intestinale est imperméable. Cette fraction seule sera active, c'est elle seule qui provoquera l'absorption du chlorure sodique. Il en serait encore ainsi même dans le cas, où la solntion de NaCl introduite dans le tube digestif aurait une tension osmotique supérieure à celle du plasma.

Comme il a été dit, Gryns avait été amené, dans ses essais sur les sels alcalins, à faire intervenir la dissociation électrolytique. pour expliquer les propriétés différentes des divers sels d'ammonium. D'après lui, les sels d'ammonium pénétrants doivent être considérés comme formés de deux ions pénétrants, les non pénétrants sont les sels d'ammonium des acides dont l'ion électro-négatif ne pénètre pas. Une hypothèse semblable avait déjà été mise en avant par Koeppe pour expliquer la sécrétion de l'acide chlorhydrique de l'estomac. Le même auteur étudia au même point de vue quelques particularités intéressantes de l'action des sels alcalins sur les globules rouges.

De ses précédentes recherches au moyen de l'hématocrite, Koeppe avait tiré pour le coefficient de dissociation du chlorure sodique en concentration isotonique, une valeur $i = 1,6$ alors que les recherches de Raoult et d'Arrhenius lui assignent la valeur $i = 1,9$. Pour le carbonate de soude, l'hématocrite avait donné $i = 2,68$, tandis que les mêmes physiciens fixent $i = 2,18$. La méthode physiologique donnait donc une valeur trop faible dans le premier cas, trop forte dans le second.

Une expérience de Gürber, qu'il répéta en la variant quelque peu, lui fournit l'explication du désaccord. Quand on lave les globules rouges avec une solution isotonique de sucre, jusqu'à les débarrasser des dernières traces du sérum qui les mouillait, qu'on sature la bouillie corpusculaire d'anhydride carbonique, puis qu'on la met en suspension dans une solution isotonique de chlorure sodique, celle-ci devient alcaline et perd une certaine quantité de son chlore. Le même résultat s'obtient si l'on emploie du KCl, tandis que le résultat est négatif avec du sulfate de soude ou de potasse. Des globules artérialisés par l'agitation à l'air n'influencent nullement l'alcalinité de la solution. Gürber avait déjà prouvé par des dosages directs, que l'alcalinisation n'était pas due à une sortie d'alcali hors des globules, comme l'avait cru Zuntz. Koeppe explique le fait par des passages d'ions en quantité équivalente à travers la paroi globulaire.

Prenons le cas des globules veineux dans une solution de chlorure de potassium. Il s'établit immédiatement entre les hématies et le liquide extérieur un échange d'eau qui a pour effet de réaliser pour ainsi dire instantanément l'égalité de la pression osmotique dans les globules et autour d'eux. Or, dans le liquide extérieur cette pression est uniquement fonction de KCl; à l'intérieur, elle dépend de KCl, de K_2CO_3 et d'autres substances dissoutes dans le suc cellulaire, la somme de ces tensions partielles étant égale à la pression du chlorure potassique extra-globulaire. Il y a donc hors du globule une tension partielle de Cl^- beaucoup plus forte que dans le globule, où par contre la tension de $CO_3^=$ est considérable, alors qu'elle est nulle au dehors. Or, la paroi globulaire est perméable, comme on l'a vu, à $CO_3^=$ et à Cl^-, imperméable à K. Il a été dit également plus haut que, lorsque des deux ions d'une molécule dissociée, un seul peut passer, il en est empêché par l'autre, dont la charge électrique le retient. Mais dans le cas présent, l'obstacle est levé, puisque, au fur et à mesure que des ions Cl pénètrent dans le globule, ils sont remplacés dans le liquide ambiant par des ions CO_3 qui ont une charge électrique de même nom. Une partie du KCl extérieur sera donc bientôt remplacé par du K_2CO_3, ce qui déterminera l'alcalinité du liquide.

Si au lieu de KCl, il y avait du K_2SO_4 dans le liquide extérieur, l'échange ne pourrait avoir lieu puisque l'ion $SO_4^=$ ne traverse pas la paroi globulaire.

Cette façon d'envisager les choses est extrêmement intéressante et il semble que l'explication rende compte de toutes les données de l'expérience.

D'autre part, si CO_3 est équivalent au point de vue de sa charge électrique à 2Cl, il n'en est pas de même au point de vue de la pression osmotique, où $1CO_3$ et 1Cl sont équivalents. C'est ce qui explique, d'après Koeppe, que les valeurs trouvées pour l'équivalent osmotique ou le coefficient de dissociation de NaCl, KCl sont trop faibles, trop fortes au contraire pour Na_2CO_3, K_2CO_3, absolument exactes pour Na_2SO_4, K_2SO_4.

Comme on le voit, Koeppe admet une imperméabilité absolue de la paroi globulaire vis-à-vis des ions des métaux alcalins K et Na, et limite aux ions électro-négatifs les échanges opérés entre globules et milieu extérieur.

L'absorption du chlore du sérum par les globules sous l'influence de CO_2 avait déjà été démontrée par Hamburger [1], mais cet auteur ne tenant pas compte des phénomènes de dissociation, avait admis un échange des *molécules* du sérum au globule, échange qu'il supposait équivalent au point de vue osmotique.

Cette question si intéressante de la pénétration soit d'ion soit des

molécules dans les globules, fut traitée d'une façon approfondie dans un mémoire très important de Hedin [1].

La méthode employée par cet auteur repose sur le principe suivant.

Prenons un volume de sang S et le même volume P du plasma de ce sang : à l'un et l'autre ajoutons la même quantité de la substance dont il s'agit de déterminer le pouvoir pénétrant dans les globules. Déterminons actuellement la valeur de la pression osmotique, ou, ce qui revient au même, l'abaissement du point de congélation après centrifugation dans le plasma de S, et dans P. Soit a, le chiffre correspondant à S, soit b celui correspondant à P. Trois cas peuvent se présenter : $a > b$ ou $\frac{a}{b} > 1$, ce qui indiquera que la substance ajoutée au sang est restée en grande partie ou en totalité dans le plasma ; $a = b$ ou $\frac{a}{b} = 1$, signifiant que le partage dans le sang s'est fait uniformément entre globules et plasma ; $a < b$ ou $\frac{a}{b} < 1$, quand la substance dissoute se concentre à l'intérieur des globules.

En réalité, la méthode est un peu plus compliquée. La dissolution de la substance dans le sang doit se faire moyennant certaines précautions en vue d'éviter la détérioration des globules ; quand la substance étudiée est globulicide, il faut neutraliser son action par l'adjonction de corps neutralisant l'effet nocif. Il faut encore tenir compte de l'action dilatante ou rétrécissante de la substance sur les globules, et aussi de la quantité absolue de ceux-ci dans le sang normal.

D'autre part, en raison des hypothèses faites par différents auteurs sur des échanges possibles, soit de molécules, soit d'ions entre les globules et le liquide qui les baigne, il fallait s'assurer, si, dans le cours des expériences, pareils échanges ne s'effectuaient pas. Pour ce faire, Hedin opéra, dans un grand nombre de cas, le dosage de la substance dans le plasma du sang examiné. Connaissant ainsi la quantité absolue du corps en expérience dans le plasma, il pouvait calculer l'abaissement du point de congélation y correspondant et voir, si cette valeur était celle que lui fournissait la détermination directe. Si, oui, la conclusion s'imposait : nul échange ne pouvait s'être opéré entre globules et plasma.

Ayant appliqué la méthode aux sucres (saccharose, glycose, lactose, galactose, arabinose) il trouva pour $\frac{a}{b}$ des valeurs moyennes allant de 1,46 à 1,53. Or dans les conditions de l'expérience $\frac{a}{b}$ devenait égal à 1,53, pour une substance hypothétique qui serait restée confinée exclusivement dans le plasma. D'où la conclusion que les sucres se comportaient en réalité de la même manière et qu'il fallait concevoir la paroi globulaire comme absolument imperméable pour eux. Il en était de même

pour la mannite (alcool hexatomique) et l'adonite (alcool pentatomique).

L'érythrite donne pour $\frac{a}{b}$ une valeur de 1,49, quand on opère les déterminations immédiatement après le mélange, de 1,20, quand elles sont faites après 24 heures. Pour la glycérine, la valeur de $\frac{a}{b}$ descend rapidement de 1,38 à 1,11, en même temps que le volume des globules rouges, qui s'étaient primitivement rétractés, revient à son volume primitif. Quand $\frac{a}{b} = 1,11$, le volume des globules rouges est le même que s'il n'y avait pas de glycérine dans le sang, malgré le léger excès dans le plasma. Le glycol (alcool biatomique) donne immédiatement à a la valeur de 1,13 et les globules se comportent comme si au lieu d'une solution de glycol, on avait ajouté de l'eau.

Pour l'alcool méthylique $\frac{a}{b} = 1$; pour l'alcool éthylique 0,97. Les autres termes de la série présentent des valeurs approchantes, ce qui indique un partage presque égal entre plasma et globules avec un léger excès dans ces derniers. La valeur de $\frac{a}{b}$ diminue encore pour les aldéhydes des acides gras, pour les cétones, les éthers simples et composés. Pour le chloral, elle est 0,90; pour l'éther sulfurique, elle atteint un minimum de 0,54. Ici nous nous trouvons dans les conditions inverses de celles que présentaient les sucres : les substances se trouvent en grand excès dans les globules.

Pour l'urée $\frac{a}{b} = 1,06$, pour l'uréthane 1,03, l'antipyrine 1,03, l'acétamide 1,1, ce qui indique un partage presque égal entre plasma et globules, comme l'avaient déjà montré les recherches de Gryns et de Schondörff. Les acides aminés tels que le glycocolle, l'alanine, l'asparagine donnent pour $\frac{a}{b}$ les valeurs moyennes 1,40 pour les premiers, 1,30 pour la dernière.

Il en est de même pour les sels de potassium et de sodium, pour lesquels la valeur moyenne de $\frac{a}{b}$ est 1,40. Les sels examinés sont le nitrate et le chlorure des deux métaux. Étant donné que le chiffre indiquant une imperméabilité absolue est 1,53, atteint par les sucres, il y a lieu d'admettre que les sels alcalins, tout en étant localisés presque exclusivement dans le plasma, pénètrent cependant partiellement dans les globules. Il est bon de remarquer ici que pour ces sels, Hedin n'a pas pu constater le moindre échange d'ions électro-négatifs, ce qui indiquerait, en se conformant aux idées de Kœppe, que le sang employé était artériel. D'autre part il est regrettable que Hedin n'ait pas appliqué sa méthode aux carbonates alcalins. Les sels d'ammonium

se sont comportés dans les expériences de Hedin comme le faisaient prévoir les recherches de Gryns. Tandis que pour le chlorure et le bromure $\frac{a}{b}$ se rapproche de l'unité, pour le sulfate, la valeur moyenne trouvée est 1,31.

Dans un travail complémentaire, Hedin étudie par la même méthode d'autres sels d'ammonium et il arrive à la constatation que le phosphate, le tartrate, le succinate se comportent en toute manière comme le sulfate. En ce qui concerne ce dernier, il établit des différences d'action correspondant à des concentrations différentes.

A des dilutions très fortes (0,05 gr-mol par litre) le rapport $\frac{a}{b}$ devient pour $A_{m_2} SO^4$ égal à 0,99, c'est-à-dire qu'à cette concentration le sulfate se comporte comme le chlorure, pour tendre vers des valeurs supérieures avec l'augmentation de la concentration.

A côté du chlorure et du bromure se rangent le nitrate, le sulfocyanate, l'oxalate, le ferrocyanure, le ferricyanure, le lactate, l'éthylsulfate. Pour ces quatre derniers sels, la valeur $\frac{a}{b}$ diminue également mais faiblement avec la concentration, tandis que pour les premiers, dans les limites des observations, la valeur de $\frac{a}{b}$ semble indépendante de la teneur de la solution.

Les sels de triméthylamine et d'éthylamine se comportent comme ceux d'ammoniaque. Le chlorure est pénétrant en toute concentration, le sulfate pénétrant dans des solutions très diluées, de moins en moins pénétrant avec l'augmentation de la concentration.

D'une façon générale, ces résultats confirment, tout en les complétant, les principales conclusions de Gryns.

En ce qui concerne les substances dissociées, ils mettent en évidence la part qui revient aux ions considérés isolément, dans les propriétés d'ensemble des substances. C'est ce que montrent particulièrement les dernières observations ayant trait aux sels d'ammoniaque et des bases azotées. Pour les substances non dissociées, les recherches sur la série des alcools indiquent nettement l'influence du groupe hydroxile dans les propriétés de la molécule. Mais le résultat général qui se dégage des travaux de Hedin comme de tous les précédents, c'est que dès maintenant, il faut rapporter à des faits d'osmose les propriétés de toutes les substances, si différentes cependant au point de vue chimique, dont l'action a été essayée sur les globules rouges. Tant pénétrantes, que non pénétrantes, ces substances agissent en solutions pures ou en mélanges non en raison de leurs propriétés chimiques, mais suivant des principes tout différents.

C'est ainsi que telle substance, nocive en concentration faible, per-

dra toute nocuité, quand la solution sera suffisamment enrichie, que telle autre ne montrera ni en quantité ni en qualité aucune différence dans ses propriétés nocives, quel que soit l'écart des concentrations employées; toutes choses incompréhensibles pour qui voudrait voir dans ces phénomènes des faits de combinaison ou de décomposition. Si certains détails restent à préciser, l'ensemble est définitivement assis et sous plus d'un rapport la physiologie des globules rouges pourra servir d'exemple à celle d'autres organes. Car les résultats acquis s'étendent bien au delà de la physiologie du sang, les faits sont d'ordre général, d'où leur grand intérêt.

L'étude des conditions de perméabilité de la paroi globulaire, c'est l'étude de l'une des propriétés les plus importantes du protoplasme animal, et, sous ce rapport, il est intéressant de faire remarquer ici qu'il résulte d'observations faites par Overton sur le pouvoir absorbant de la paroi des cellules végétales, que celle-ci se comporte vis-à-vis de la plupart des substances examinées par Gryns et Hedin comme la paroi des globules rouges. Il n'y aurait de différence que pour les sels ammoniacaux et l'urée, dont le protoplasme végétal ne laisserait passer que peu ou prou. Cependant il est probable que de pareilles ressemblances ne portent que sur les grandes lignes, et que, dans le même organisme, les cellules des divers organes, ayant à accomplir des opérations chimiques différentes, absorbant ou excrétant des produits différents, doivent également montrer des différences dans l'électivité de leur paroi vis-à-vis des matières dissoutes dans les milieux liquides.

Pour en revenir aux globules rouges envisagés spécialement au point de vue de leur constitution intime, l'étude qui a été faite de leurs propriétés osmotiques a révélé une analogie complète entre leur façon de se comporter et celle des cellules végétales. On est en droit de conclure de la similitude de propriétés à une similitude de constitution.

D'autre part, cellules végétales et globules se conduisent complètement, dans les nombreuses expériences citées précédemment, comme des vésicules limitées par une paroi semi-perméable, absolument comparable à la membrane de ferro-cyanure de cuivre. L'analogie est absolue, elle rend compte aussi bien des observations faites sur l'action des solutions salines, que de celles portant sur la façon d'agir des poisons globulaires. Bien plus, l'exception apparente que semblaient faire ces derniers aux lois de l'osmose, en est devenue la confirmation la plus éclatante; depuis, les travaux de Gryns et de Hedin nous ont montré le rapport existant entre la toxicité d'une substance et sa faculté de pénétrer le globule.

Il y a donc lieu de considérer le globule rouge comme constitué essentiellement d'une paroi demi-perméable enfermant un contenu

liquide. Que ce liquide soit placé dans une cavité unique ou dans une multitude de vacuoles, la chose importe peu au point de vue physiologique. C'est affaire aux histologistes de trancher ce point de détail. Le liquide intra-cellulaire contient des substances en solution. Les échanges de ces dernières avec le milieu extérieur sont réglés par leur passage plus ou moins facile à travers la paroi globulaire. Nous savons pour quelques uns d'entre eux, les sels de potassium, par exemple, que leur passage doit être faible en raison du coefficient d'absorption peu élevé du globule vis-à-vis d'eux.

L'hémoglobine, qui est certes le constituant le plus important du suc cellulaire, est absolument non pénétrante par rapport à la paroi, comme le prouve le fait que toute diffusion de cette substance colorante à l'extérieur est la conséquence d'une altération de l'enveloppe du globule. Bien loin donc de faire admettre une combinaison de l'hémoglobine avec la stroma globulaire, les études précédentes prouvent que l'hémoglobine ne peut même pas l'imprégner pendant la vie de l'hématie; il faut la mort de celle-ci pour que le phénomène se produise.

Anciennement l'opinion prévalait d'une combinaison chimique lâche de l'hémoglobine avec d'autres constituants globulaires. Sans vouloir exposer les nombreuses raisons qui ont été alléguées contre cette manière de voir, il suffira de montrer ici en quelques mots la difficulté, sinon l'impossibilité d'allier une pareille hypothèse avec les faits mis en lumière dans les travaux analysés dans cette revue.

Il faudrait d'abord s'entendre sur la nature de cette combinaison. Est-elle d'ordre purement chimique, ou se range-t-elle parmi les phénomènes de teinture?

On est en droit de rejeter immédiatement la première hypothèse. Car admettre de la part de l'eau distillée un pouvoir dissociant assez grand, pour qu'elle puisse provoquer presque instantanément à la température ordinaire la destruction intégrale du complexe chimique; admettre également que ce pouvoir soit exactement neutralisé par des *équivalents osmotiques* de substances prises au hasard parmi les diverses espèces chimiques. ce serait formuler des suppositions en contradiction avec tout ce que nous apprend la chimie.

La seconde hypothèse ferait du globule une parcelle fibrineuse imprégnée, teinte d'hémoglobine. Celle-ci serait fixée sur la trame globulaire, à la façon d'une matière colorante sur un tissu, par une affinité spéciale, l'affinité mécanique d'Ostwald. Cette conception ne permettrait pas mieux que la précédente de comprendre pourquoi, par exemple, les mêmes concentrations hypisotoniques de toutes les substances non pénétrantes permettent la mise en liberté de la matière colorante. Rien dans les faits réels de teinture ne rappelle pareil phé-

nomène. D'ailleurs, si des globules, placés dans l'eau distillée, lui abandonnent leur hémoglobine, il faudrait dans cette hypothèse, que l'adjonction de 1 0/0 de chlorure sodique ait pour conséquence la refixation de l'hémoglobine sur le stroma, puisque dans la solution de 1 0/0 de chlorure sodique, le globule intact retient sa matière colorante.

Les faits sont d'ailleurs tellement démonstratifs qu'il semble superflu de poursuivre cette démonstration.

Il était cependant utile d'insister sur ce point, pour montrer la grande importance que peuvent prendre certaines expériences de physiologie, non pas seulement au point de vue de nos opinions sur le mode d'activité des tissus vivants, mais sur leur structure même, leur constitution anatomique.

La destruction des globules, comme conséquence de phénomènes osmotiques, semble pouvoir être amenée de deux manières : l'eau pure la provoque en déchaînant les forces osmotiques intérieures, dont la poussée, libérée de toute entrave, amène rapidement la déchirure de l'enveloppe; ainsi semblent agir aussi les solutions de certains corps, comme l'urée.

Au contraire, d'autres substances, et le chlorure ammonique en est, seraient plus nocives que l'eau distillée. Il est utile, pour se rendre compte de ces derniers faits, qui, à première vue, semblent constituer des exceptions aux lois strictes de l'osmose, d'envisager d'un peu plus près les rapports des liquides intra et extra-cellulaire avec la paroi du globule. Celle-ci est constituée par une substance ou un mélange de substances, insoluble dans l'eau pure ou dans les solutions salines peu concentrées, mais imbibée de liquide. Or il est certain que le degré et la nature de cette imbibition dépendent de la nature des solutions en contact avec la paroi et de leur concentration.

Quand le globule est en équilibre osmotique avec le liquide extérieur, l'équilibre total résulte de deux équilibres partiels, celui du liquide extérieur avec la paroi, et celui de la paroi avec le suc intra-cellulaire. Introduisons du sucre, une substance totalement non pénétrante, dans le liquide extérieur, l'équilibre total est rompu, mais il se rétablit rapidement par une sortie d'eau pure au travers de l'enveloppe, sans que celle-ci y prenne activement part (tout au plus pourra-t-elle y perdre un peu d'eau d'imbibition). Mais que la substance ajoutée soit pénétrante : cette épithète signifie que la substance imprègne la paroi, *qu'elle est soluble dans celle-ci*. Il se produira un double partage de la substance : d'une part, entre le liquide extérieur et la paroi, d'autre part, entre la paroi et le liquide intérieur. Les choses se passeront comme si l'on ajoutait à un mélange de trois liquides non miscibles, une substance inégalement soluble dans ces trois liquides. Le partage

se fera entre les trois couches liquides suivant les coefficients de solubilité de la substance dans ces trois dissolvants.

Or, dans les expériences de Hedin, nous sommes renseignés sur la distribution entre le liquide extérieur d'une part, et la somme de la paroi plus le liquide intérieur d'autre part.

Mais rien ne nous indique les conditions du partage intra-globulaire entre enveloppe et contenu. Il est probable, bien qu'aucune expérience directe n'ait été faite sur ce sujet, que ce partage sera très différent suivant les cas. Et l'on peut concevoir *a priori* que pour certaines substances pénétrantes, la localisation se fera surtout dans le liquide intra-cellulaire, pour d'autres dans la paroi protoplasmique. Dans ce dernier cas, celle-ci ne sera donc plus imbibée par son liquide ordinaire, mais par une solution de composition tout autre. Quelles seront les conséquences de cet état anormal?

Des expériences de Hofmeister permettent de se faire une idée à ce sujet. Ayant plongé dans diverses solutions salines, de petits disques de gélatine pure, il constata que ces disques s'imprègnent généralement de ces solutions, mais prennent de celles-ci une quantité variable suivant les sels et les concentrations. Pour un même sel, il y a un optimum de concentration, pour lequel la quantité de liquide absorbée par le disque est maxima, et celle-ci dépasse alors notablement la quantité d'eau pure absorbée par un disque témoin, baignant dans l'eau distillée. Ce qui veut dire que la *présence du sel dans la gélatine a augmenté dans des limites très larges sa perméabilité pour l'eau*. Ces faits ne sont que l'expression d'une loi de physique, disant que tout liquide (ou solide) ayant dissous une substance quelconque, possède de nouveaux coefficients de pouvoir dissolvant vis-à-vis d'autres substances.

Il faut donc s'attendre à voir changer ces coefficients dans la paroi d'un globule qui serait imprégnée d'une substance très soluble dans celle-ci. Cette paroi présentera vis-à-vis des deux milieux liquides qu'elle sépare, de nouvelles conditions de pouvoir dissolvant, c'est-à-dire de perméabilité. Et l'on peut concevoir un état tel, que l'impénétrabilité absolue de l'hémoglobine soit supprimée, ce qui aura immédiatement pour résultat un partage de cette substance entre liquide intérieur, paroi, liquide extérieur, c'est-à-dire une diffusion de l'hémoglobine dans le milieu ambiant.

De sorte qu'ici encore les seules lois physiques de solution et d'osmose suffisent pour rendre compte de tous les faits.

D[r] P. Nolf.

BIBLIOGRAPHIE

1. HAMBURGER. — *Ueber den Einfluss chemischer Verbindungen auf Blutkörperchen im Zusammenhang mit ihren Moleculargewichten.* — *Archiv für Physiologie* de du Bois-Reymond, 1886.

2. HAMBURGER. — *Ueber die durch Salz-und Rohrzucker-Lösungen bewirkten Veränderungen der Blutkörperchen.* — *Arch. f. Physiol.* de du Bois-Reymond, 1887.

3. HAMBURGER. — *Die Permeabilität der rothen Blutkörperchen im Zusammenhang mit den isotonischen Coëfficienten.* — *Zeitschrift für Biologie*, 1890.

4. HAMBURGER. — *Centralblatt für Physiologie*, 1893, p. 161, 656, 758.

5. S. G. HEDIN. — *Der Hämatokrit, ein neuer Apparat zur Untersuchung des Blutes*, p. 134. — *Untersuchungen mit dem Hämatokrit*, p. 360. — *Skandinavisches Archiv für Physiologie*, 1891.

6. S. G. HEDIN. — *Ueber die Einwirkung einiger Wasserlösungen auf das Volumen der rothen Blutkörperchen*, p. 207. — *Ueber den Einfluss von Salzlösungen auf das Volumen der rothen Blutkörperchen*, p. 238. — *Skandinavisches Archiv für Physiologie*, 1895.

7. KOEPPE. — *Ueber den Quellungsgrad der rothen Blutscheiben.* — *Archiv* de du Bois-Reymond, 1895.

8. GRYNS. — *Ueber den Einfluss gelöster Stoffe auf die rothen Bluzellen in Verbindung mit den Erscheinungen der Osmose und Diffusion.* — *Pflüger's Archiv für die gesammte Physiologie*, 1896. Bd. 63.

9. KOEPPE. — *Der osmotische Druck als Ursache des Stoffaustausches zwischen rothen Blutkörperchen und Salzlösungen.* — *Pflüger's Archiv für die gesammte Physiologie*, 1897. Bd 67.

10. HAMBURGER. — *Ueber den Einfluss der Athmung auf die Permeabilität der Blutkörperchen.* — *Zeitschrift für Biologie*, 1891.

11. HEDIN. — *Ueber die Permeabilität der Blutkörperchen.* — *Pflüger's Archiv für die gesammte Physiologie*, 1897. Bd 68.

12. HEDIN. — *Versuche über das Vermögen der Salze einiger Stickstoffbasen in die Blutkörperchen einzudringen.* — *Pflüger's Archiv für die gesammte Physiologie*, 1898. Bd 70.

13. HOFMEISTER. — *Zur Lehre von der Wirkung der Salze.* — *Archiv für experiment. Pathologie und Pharmacologie.* Bd 28.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

Le Gérant : G. MASSON.

14me ANNÉE AOUT 1900 N° 8

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES
SUR LE CHARBON SYMPTOMATIQUE

PAR MM. E. LECLAINCHE ET H. VALLÉE
de l'École vétérinaire de Toulouse.

TROISIÈME PARTIE
IMMUNISATION

Nos recherches ont porté sur trois des modes possibles de l'immunisation : les inoculations de virus-vaccins, les inoculations de cultures pures et l'emploi d'un sérum immunisant.

I

IMMUNISATION PAR LES VIRUS-VACCINS

Nous avons montré, dans les premières parties de cette étude, que l'inoculation des cultures du *Bacterium Chauvœi*, chauffées à 80-85° pendant deux ou trois heures, ne tuent pas les animaux, mais qu'elles ne confèrent aucune immunité. La toxine perd ses propriétés chimiotaxiques négatives sous l'influence du chauffage, et les spores sont phagocytées avant d'avoir germé.

On sait d'autre part que la vaccination est réalisée, d'après la méthode de MM. Arloing et Cornevin, avec des liquides organiques virulents desséchés à 37°, puis chauffés pendant sept heures à des températures comprises entre 90 et 104°.

Comment y a-t-il action vaccinante en ces conditions, alors qu'elle n'est point constatée, dans nos expériences, après un traitement beaucoup moins sévère de la matière virulente?

1. Les deux premières parties de ce mémoire ont été publiées dans ces *Annales*, numéro du 25 avril 1900, page 202.

La solution de cette apparente contradiction présente un certain intérêt; elle exige l'étude préalable des vaccins actuellement utilisés.

Étude des virus-vaccins de Lyon. — Les vaccins lyonnais sont préparés avec des jus virulents recueillis dans les tumeurs d'animaux infectés; le liquide, desséché à 37°, donne une poudre brune, renfermant les spores virulentes. On mélange une partie de poudre à 2 parties d'eau, et la dilution, étalée en couche mince, est portée à l'étuve. Le 1er vaccin est obtenu par le chauffage à 100-104° pendant 7 heures; le 2e vaccin est chauffé à 90-94° pendant le même temps. Les résidus sont constitués par des écailles brunes d'albumine englobant les spores.

Une trituration sommaire donne des poudres qui sont expédiées dans des enveloppes de papier renfermant dix doses de vaccin.

Pour pratiquer la vaccination des bovidés, on dilue la poudre dans l'eau bouillie, et l'on insère dans le tissu conjonctif sous-cutané, de préférence à l'extrémité de la queue, une quantité déterminée de la dilution. La même technique est applicable à l'inoculation du 2e vaccin, pratiquée douze jours plus tard.

En règle très générale, les animaux ne présentent à la suite de la vaccination qu'une faible tuméfaction inflammatoire locale, et l'on ne constate point de troubles généraux. Ils supportent, quelques jours après la seconde vaccination, une inoculation virulente qui provoque des accidents graves chez les témoins ou qui les tue rapidement.

Le premier virus-vaccin inoculé au cobaye, sous la peau du ventre, à la dose de 4 à 6 centigrammes, provoque des phénomènes immédiats peu graves. Des accidents locaux sont exceptionnels; ils font le plus souvent défaut si l'on pratique l'épreuve chez des cobayes très jeunes (1 à 2 mois). Parmi les animaux inoculés, les uns survivent indéfiniment, d'autres meurent à longue échéance, très amaigris. Signalons dès maintenant la remarquable résistance des cobayes jeunes, plusieurs fois contrôlée et utilisée dans le cours de nos recherches.

Il est facile de rendre au premier vaccin sa virulence; il suffit pour cela d'associer à la dilution de poudre quelques gouttes d'acide lactique; dans ces conditions, des doses de 6, 4 et 2 centigrammes de poudre tuent trois fois sur quatre. Les cobayes

succombent en 16-48 heures; les lésions locales sont considérables, mais elles ne rappellent qu'imparfaitement celles qui appartiennent au charbon. Les tissus envahis ont une teinte rouge foncé ou noire; ils répandent une odeur fortement putride. L'examen direct des sérosités montre, avec des bactéries charbonneuses sporulées, diverses formes microbiennes associées. Parmi elles, on retrouve constamment un bacille trapu, très court, fixant fortement le Gram, et un autre, plus petit, conservant aussi la coloration de Gram.

On ne trouve pas le vibrion septique à la surface du foie. Le sang du cœur, recueilli en ampoules scellées portées à l'étuve, cultive en donnant des gaz; il répand une odeur infecte, toute différente de celle des cultures du *Bacterium Chauvæi;* on y retrouve les formes déjà signalées.

Le deuxième vaccin, inoculé d'emblée au cobaye, tue presque toujours. Dix cobayes reçoivent chacun, dans la cuisse droite, 2 centigrammes de poudre vaccinale; huit meurent en des temps qui varient entre 36 heures et 12 jours. Chez ceux qui succombent rapidement, on constate une forte tuméfaction inflammatoire locale; les tissus infiltrés, macérés, de teinte noire, répandent une odeur de putréfaction; lors d'évolution retardée on trouve, au niveau du point d'inoculation, une tumeur dure, formée d'un tissu lardacé, creusée dans ses parties profondes de logettes renfermant un pus épais, verdâtre, d'odeur forte, contenant un fin bacille sporulé et le bacille trapu trouvé déjà dans le premier vaccin.

Additionné d'acide lactique, le 2e vaccin tue à coup sûr en 18-30 heures, à la dose de 2 centigrammes. La cuisse inoculée est le siège d'un œdème énorme qui dissèque et envahit les parties voisines; les tissus répandent une odeur infecte; on retrouve, avec les formes mentionnées, des impuretés diverses.

Ces premiers résultats montrent que l'on inocule, en même temps que les vaccins, des microbes étrangers, capables de pulluler dans les tissus animaux, chez le cobaye tout au moins.

La présence des impuretés contenues dans les vaccins est encore décelée par l'ensemencement des poudres, chauffées au préalable pour les débarrasser des souillures imputables aux manipulations.

Divers échantillons de vaccins sont émulsionnés dans l'eau

stérilisée, puis la dilution est chauffée en ampoules, au bain-marie, à 70-80, pendant une demi-heure. On sème, ensuite une goutte du liquide chauffé, en bouillon Martin, à l'air et dans le vide. Les résultats obtenus sont identiques pour les deux vaccins et pour les divers échantillons. Dans tous les cas le bouillon présente en quelques heures un aspect trouble, analogue à celui des cultures du *B. coli*; il répand une odeur forte qui participe à la fois de l'odeur aigrelette du charbon symptomatique, et de l'odeur spéciale du tétanos. On trouve, avec le *Bacterium Chauvœi*, un gros bacille à extrémités arrondies, cultivant en voile à la surface, un bacille en épingle, analogue au bacille tétanique, et quelquefois des streptocoques.

La constance de la flore parasite montre assez qu'il s'agit de microbes associés aux poudres-vaccins. On sait que les « tumeurs symptomatiques » du charbon naturel ou expérimental, qui fournissent les jus virulents destinés à la préparation des vaccins, renferment très souvent des formes microbiennes surajoutées ; d'autre part, de multiples souillures sont inévitables pendant la première phase de la préparation des vaccins; il s'opère ainsi une sélection d'anaérobies très résistants à la chaleur.

Une longue expérience montre que, généralement, ces impuretés n'ont point d'influence fâcheuse en ce qui concerne les bovidés. De 1884 à 1895, les statistiques accusent une mortalité inférieure à 1 p. 1,000, sur un total de 400,000 vaccinés environ. On signale cependant quelques cas de suppuration, de gangrène et même de tétanos. En certaines séries aussi, notamment lors de la vaccination sur le thorax, une évolution charbonneuse est constatée; elle survient presque toujours après l'insertion du deuxième vaccin, et l'on ne saurait par suite l'imputer à la trop grande réceptivité des animaux. Enfin, de 1896 à 1899, le nombre des accidents consécutifs à la vaccination s'est subitement accru, et la mortalité s'est élevée jusqu'à 4 p. 100 en certaines localités.

On connaît assez l'influence puissamment favorisante des associations microbiennes dans le charbon — et les expériences de M. Roger sont probantes à cet égard — pour penser que les impuretés contenues dans les vaccins jouent un rôle dans la genèse de certaines au moins des complications signalées. Il est évident *a priori* qu'il ne saurait y avoir que des avantages à

opérer avec des produits organiques virulents propres, tels qu'ils peuvent être obtenus chez des animaux tués rapidement par des cultures pures.

L'obtention des vaccins purs devient indispensable si l'on veut analyser leurs propriétés par l'inoculation au cobaye; on a vu que les germes associés masquent et dénaturent entièrement le rôle de la bactérie du charbon.

Préparation des vaccins purs. — Si les tumeurs musculaires des inoculés renferment souvent des microbes étrangers, le sang de la grande circulation est habituellement pur. Chez des animaux, cobayes ou moutons, tués par l'inoculation intra-musculaire d'une culture virulente, on recueille le sang du cœur, aussitôt après la mort, dans des ampoules remplies entièrement ou soumises à l'action de la trompe. On laisse à l'étuve pendant 48 heures au moins, pour permettre la sporulation, puis le contenu, à peu près entièrement liquéfié, est répandu et étalé en couche mince dans des boîtes de Petri stérilisées. Celles-ci sont déposées de nouveau à l'étuve pendant 3 ou 4 heures, pour obtenir la dessiccation.

Le virus sec ainsi préparé est soumis au traitement indiqué par M. Arloing. La poudre est triturée dans son volume d'eau et la dilution versée en couche mince sur des plaques qui sont portées à l'étuve à air chaud. On chauffe pendant 7 heures à 102° pour obtenir le premier vaccin et à 92°, pendant le même temps, pour préparer le second vaccin. La matière desséchée est pulvérisée et répartie purement dans des tubes stériles.

On peut obtenir par cette méthode une provision de vaccins purs ; chez le cobaye et chez le mouton infectés, il est facile de recueillir directement dans le cœur la quasi-totalité du sang pendant la période agonique.

Une autre méthode est utilisable qui permettrait de produire économiquement des quantités considérables de vaccins. Le *Bacterium Chauvœi* cultive volontiers dans le sang. Des ballons, ensemencés au préalable, sont remplis de sang puisé directement dans la jugulaire du cheval, soumis à l'action de la trompe, scellés sous le vide et déposés à l'étuve, à 37°.

Une culture s'opère, avec dégagement de gaz et digestion du caillot ; le sang liquéfié, riche en éléments sporulés, convient parfaitement pour la préparation des poudres vaccinales.

Ensemencés en bouillon Martin, les vaccins ainsi préparés donnent des cultures pures de la bactérie.

Étude des vaccins purs. — Le premier vaccin — obtenu par le chauffage à 102° — est inoculé impunément au cobaye jeune à la dose de 5 centigrammes; il faut une dose de 10 centigrammes pour tuer un cobaye du poids de 100 grammes.

Le deuxième vaccin — obtenu par le chauffage à 92° — tue au contraire le cobaye à la dose de 5 centigr. Une dose de 2 centigr. ne provoque que des accidents locaux insignifiants.

Additionnés d'acide lactique, les deux vaccins tuent à la dose de deux centigr. en 17 à 30 heures. Tous deux se comportent de façon identique : ils donnent, dans le même temps, les mêmes accidents chez les cobayes inoculés. Si l'autopsie est pratiquée aussitôt après la mort, on ne rencontre dans les sérosités et dans les tumeurs que les seules bactéries du charbon symptomatique.

Les cobayes inoculés successivement avec les deux vaccins purs acquièrent une immunité solide et durable. Le même résultat est obtenu par l'inoculation d'emblée du 2e vaccin à la dose de 2 centigr.; les cobayes vaccinés résistent, après 12 ou 15 jours, à une inoculation virulente qui tue les témoins à coup sûr.

Dans ces conditions, l'analyse du mécanisme de l'immunisation produite devient possible.

D'après MM. Arloing et Cornevin, le virus du charbon a subi une « atténuation passagère » sous l'influence du chauffage de la spore. Il est facile de s'assurer qu'en effet les vaccins n'ont subi aucune modification héréditaire. Les cultures obtenues avec le second ou le premier vaccin sont pleinement virulentes.

La spore chauffée n'est nullement modifiée dans ses propriétés. Si les virus chauffés ne tuent plus les animaux, c'est uniquement en raison de l'altération plus ou moins profonde subie par la toxine. Cette interprétation est rendue déjà vraisemblable par les résultats obtenus par M. Arloing et par Nocard et Roux, restituant aux vaccins la virulence par l'addition d'acide lactique; elle ressort nettement de l'étude du rôle respectif du microbe et de la toxine dans la genèse des lésions. L'addition d'acide lactique aux vaccins purs leur restitue la virulence.

Les virus-vaccins sont donc constitués en réalité par des spores non altérées, mais accompagnées d'une toxine plus ou

moins profondément modifiée sous l'influence du chauffage. Quant à leur action pathogène, les vaccins purs chauffés se comportent comme les spores pures; ils ne tuent pas les animaux. Cependant les conséquences de l'inoculation sont toutes différentes; alors que l'insertion des cultures chauffées à 80° pendant trois heures (spores pures) ne confère aucune immunité, la pénétration des poudres vaccinales assure une immunisation active et durable. Alors que dans le 1er cas les spores ont été aussitôt phagocytées, la destruction est ici assez retardée pour qu'une élaboration vaccinale se produise.

Le retard apporté dans la phagocytose des poudres-vaccins ne peut guère être attribué qu'à l'état physique de la matière déposée dans les tissus.

On s'explique que les spores incluses dans les particules d'albumine cuite soient garanties pendant un temps, comme lorsqu'on les associe à des corps pulvérulents. Si cette induction est exacte, la protection sera d'autant moins efficace que la poudre, plus finement divisée, constituera une barrière moins solide. Les expériences montrent que la porphyrisation d'une poudre vaccinale la destitue le plus souvent de ses propriétés immunisantes; en ce cas les poussières très fines constituent une proie plus facile pour les cellules; les spores sont ingérées assez vite pour qu'une évolution vaccinale ne puisse s'opérer.

Exp. — 1re *série*. Les cobayes 378, 379, 380 et 381 reçoivent chacun 1 centigramme de deuxième vaccin pur longuement porphyrisé. Aucun accident consécutif. L'examen du point d'inoculation, pratiqué après 15 heures, montre de nombreux leucocytes.

2e *série*. — Les cobayes 384, 385 et 386 reçoivent chacun 1 centigramme du vaccin employé précédemment, après trituration sommaire. On constate seulement un faible engorgement local.

Les cobayes des deux séries reçoivent quatorze jours plus tard 4 gouttes d'une culture virulente, en même temps que deux témoins qui succombent en 18 et 20 heures. Un seul des vaccinés de la 1re série résiste à l'épreuve; tous les autres sont tués en 17 et 20 heures avec des lésions étendues. Tous les vaccinés de la 2e série résistent entièrement.

On n'obtient point dans toutes les séries des résultats aussi complets et aussi constants; nombre de circonstances peuvent intervenir qui modifient l'action phagocytaire. Ainsi, l'introduction d'une quantité de matière excédant le pouvoir d'ingestion des cellules assure la survivance de quelques spores et

partant l'imprégnation immunisante; il en est de même sans doute lors de la pénétration accidentelle de germes étrangers capables d'entraver la phagocytose. Mais le sens des indications fournies reste au moins constant et univoque: les animaux traités par les vaccins porphyrisés ne sont point protégés; ceux qui reçoivent les poudres simplement triturées acquièrent l'immunité.

On s'explique qu'une immunisation durable soit assurée dans la très grande majorité des cas par les vaccins de MM. Arloing et Cornevin. La présence des particules solides en suspension dans le liquide injecté et la présence constante de microbes étrangers retardent suffisamment la destruction des spores. De même les quelques insuccès constatés sont expliqués par une phagocytose trop rapide des virus introduits.

II

IMMUNISATION PAR LES CULTURES PURES

L'immunisation des organismes par les cultures pures a été déjà réalisée. Kitasato constate que les cultures en bouillon âgées de plus de deux semaines ne tuent plus le cobaye et qu'elles lui confèrent l'immunité; le même résultat est obtenu avec des cultures virulentes chauffées à 80° pendant 30 minutes. Kitt[1] observe les mêmes faits et il étend l'expérimentation au mouton et aux bovidés. Une culture en bouillon qui, récente, tue le cobaye en 18-30 heures à la dose de 1 c. c., par inoculation sous-cutanée, n'est plus certainement virulente après le dixième jour; des cultures qui tuent le cobaye ne produisent chez le mouton et les bovidés qu'une évolution bénigne, à des doses de 1 à 5 c. c., et elles leur confèrent une très solide immunité. Kitt songe à utiliser dans la pratique la vaccination par les cultures pures, et il prévoit qu'il serait possible de réaliser par elles une amélioration réclamée par tous : l'immunisation par une seule inoculation; toutefois il doit reconnaître les difficultés de l'application : entretien de cultures d'âge et de virulence

1. KITT. Ueber Rauschbrandschutzimpfung mit Reinculturen (*Monatshefte für Thierheilk.*, t. V, 1893, p. 19.)

déterminés, altérabilité des virus, et nécessité d'une utilisation rapide des envois.

Nous avons repris les recherches de Kitt sur ce point.

Il est à remarquer que les méthodes de culture employées par Kitt donnent un virus relativement peu actif. Ses cultures jeunes peuvent être inoculées impunément à des doses de 1 à 3 c. c. pour le mouton et de 5 c. c. pour le bœuf jeune; d'autre part, les propriétés des cultures s'affaiblissent en peu de temps par le simple vieillissement.

La culture en bouillon Martin, pratiquée suivant le procédé que nous avons indiqué, est beaucoup plus active. Elle tue le cobaye à la dose de 3 à 4 gouttes; une dose de 1 c. c. tue le mouton en 24-36 heures, alors même qu'elle est introduite dans les veines.

Chez les bovidés adultes, l'inoculation de 2 c. c. d'une culture en bouillon Martin provoque des accidents graves immédiats et la mort plus ou moins rapide.

Exp. — Une vache âgée reçoit, à 10 heures du matin, sous la peau, en arrière de l'épaule gauche, 2 c. c. de culture virulente. Le soir, la température s'est élevée de 38°,8 à 41°,1; l'état général est grave; une plaque d'œdème chaud, douloureux, occupe le point d'inoculation. — Après 24 heures la température est à 40°,2; l'œdème a envahi toute la région, l'animal reste couché, ne mange pas. — Après 36 heures la température descend au voisinage de la normale; l'état général s'est notablement aggravé; un œdème énorme, avec crépitation, a envahi les régions de l'épaule, du fanon et du sternum.

Cet état persiste pendant plusieurs jours; l'appétit est nul. La mort arrive le septième jour. Une infiltration œdémateuse a envahi l'épaule et tout le membre inoculé, la face inférieure du ventre, une partie de l'encolure. On retrouve dans les sérosités les bactéries spécifiques.

On ne saurait donc employer comme vaccin, à la dose indiquée, les cultures récentes en bouillon Martin. Il est pourtant possible que la vaccination puisse être obtenue sans danger avec de faibles doses de culture.

Le vieillissement des cultures donne des résultats variables quant au degré de l'affaiblissement pour un même temps, et nous avons abandonné ce procédé après quelques essais.

Le chauffage des cultures, déjà utilisé par Kitasato, exerce au contraire une action constante, et constitue la méthode de choix pour l'obtention de virus affaiblis. Nous avons analysé, dans la

première partie de nos recherches[1], les effets du chauffage sur les cultures âgées de 5 jours au moins; il résulte des expériences rapportées qu'un chauffage à 75°-78°, prolongé pendant 2 heures, altère déjà notablement les propriétés du virus. Les cultures ainsi traitées sont, en tous les cas, inoffensives pour les cobayes de tout âge, à la dose de 1 c. c. Après chauffage à 70°, pendant le même temps, les cultures sont encore inoffensives pour les cobayes jeunes, mais elles tuent la plupart des adultes. On a ici un nouvel exemple de la résistance des animaux jeunes à l'infection. Les inoculés qui survivent acquièrent une immunité solide; ils peuvent recevoir 12 à 14 jours plus tard une inoculation d'une culture ou d'un jus virulent qui tue les témoins en 24 heures en moyenne.

Exp. — Les cobayes 353, 356, 357 et 409, pesant respectivement 180, 330, 340 et 650 grammes, reçoivent chacun 1 c. c. de culture chauffée à 70°. Pas d'accidents consécutifs; après 13 jours les cobayes 353 et 356 sont éprouvés par l'inoculation d'une goutte d'un jus virulent qui tue le témoin en 18 heures; les cobayes 357 et 409 reçoivent chacun 4 gouttes d'une culture qui tue le témoin en 24 heures. Les cobayes vaccinés résistent entièrement à l'épreuve.

Les propriétés nouvelles de la culture chauffée à 70° sont liées à l'altération subie par la toxine; alors que cette culture chauffée ne provoque aucun accident chez le cobaye à la dose de 1 c. c., elle tue sûrement à la dose de 1/2 c. c., si elle est additionnée de quelques gouttes d'acide lactique.

Chez les bovidés adultes, l'inoculation sous-cutanée, pratiquée en arrière de l'épaule avec 2 c. c. de culture chauffée, ne provoque aucune réaction locale, et les troubles généraux sont insignifiants.

Exp. — 21, VI. 1900. — Deux vaches âgées reçoivent, sous la peau, au niveau de l'épaule gauche, chacune 2 c. c. d'une culture très virulente chauffée, à 70° pendant 2 heures. Après 8 heures, la température s'est élevée de 38°,4 à 39°,1 pour l'une, et de 38°,6 à 39° pour l'autre; aucun trouble dans l'état général; au point d'inoculation, légère infiltration des tissus et sensibilité de la région. Après 24 heures, la température est redevenue normale et l'on ne constate plus aucun accident ultérieur.

Les bovidés qui ont reçu la culture chauffée acquièrent, comme les cobayes, une immunité solide qui leur permet de

1. Ces *Annales*, page 216.

recevoir impunément l'inoculation au thorax des cultures pures les plus virulentes, à la dose de 2 c. c.

Exp. — 28, VI. 1900. — Les deux vaches utilisées dans l'expérience précédente reçoivent 7 jours plus tard, sous la peau, en arrière de l'épaule droite, 2 c. c. d'une culture qui tue le cobaye, à la dose de 3 gouttes, en 24 heures. Chez l'une, la température s'élève de 38°,7 à 39°,2, elle oscille pendant 2 jours entre 38°,6 et 39°, pour revenir ensuite à la normale. Chez l'autre, la température monte de 38°,1 à 38°,9, avec retour à la normale après 24 heures.

Rien localement. Pas de troubles généraux.

La même culture, inoculée à la même dose à une vache âgée (Expér. déjà citée) provoque des accidents locaux et généraux et la mort de l'animal.

Les animaux qui ont reçu successivement la culture chauffée et la culture non chauffée possèdent une immunité complète. Neuf jours après la seconde injection, ils résistent à l'inoculation intramusculaire d'un jus virulent qui tue le témoin en 36 heures; l'état réfractaire est tel que *l'on ne constate pas trace de réaction chez les vaccinés*.

Exp. — Les deux vaches qui ont reçu successivement les cultures chauffées et non chauffées reçoivent, 9 jours après la deuxième inoculation, 1 c. c. de jus virulent (sérosité et jus de muscles sans addition d'eau) fourni par un cobaye tué par un virus provenant directement d'un cas de charbon accidentel du bœuf. L'inoculation est faite dans les muscles de la fesse. *On ne constate aucune réaction générale ou locale.* La température reste stationnaire. L'appétit n'est pas modifié : ni boiterie, ni altération locale[1].

Une vache témoin reçoit en même temps, dans les mêmes conditions que les précédentes, une quantité égale du même virus. Après 12 heures, l'animal est couché, très abattu; il refuse toute nourriture. La région inoculée est tuméfiée, chaude, douloureuse à l'exploration; l'appui est pénible; les déplacements provoquent une boiterie intense.

Après 18 heures. la tuméfaction a envahi tout le membre inoculé; la région est infiltrée par des gaz; on perçoit de la crépitation sous-cutanée, la peau, tendue, résonne comme un tambour. Mort dans le coma en 30 heures environ.

L'autopsie dénonce les lésions classiques du charbon symptomatique.

Ces résultats démontrent que la vaccination des bovidés

1. Les animaux ont été placés dans les conditions les plus fâcheuses pour résister à l'épreuve : après les inoculations vaccinales, ils servent à des exercices de manuel opératoire; dès le lendemain, traumatisés en divers points, les sujets reçoivent l'inoculation virulente.

adultes est réalisable par l'inoculation des cultures pures. Les avantages des produits purs sont évidents. On opère avec des virus dont les propriétés sont constantes et exactement déterminées.

La préparation et la conservation des cultures vaccins ne présentent point de difficultés. On utilisera des cultures en bouillon Martin, âgées de 5 à 8 jours. A ce moment, le développement est complètement achevé; le bouillon, qui ne renferme guère que des spores, est épuisé et impropre à une pullulation nouvelle. On répartit le liquide dans des ampoules en verre fort, de contenance déterminée : on scelle à la lampe et l'on chauffe au bain-marie, à 70°, pendant deux heures.

Le deuxième vaccin est constitué par la culture même, répartie également en ampoules scellées sous le vide.

Pour l'emploi, il suffit de couper ou de briser l'effilure de la pipette et d'aspirer directement avec la seringue.

Les vaccins liquides sont offerts sous leur forme définitive; on supprime toutes les manipulations nécessitées par l'utilisation des vaccins pulvérulents; le dosage s'opère avec une extrême facilité. La technique simplifiée est identique à celle de la vaccination contre la fièvre charbonneuse ou le rouget du porc.

La production de ces vaccins peut être pratiquement assurée. La virulence est conservée dans les cultures en bouillon Martin pendant une longue série de générations, et le passage par un organisme ne sera nécessité que de loin en loin. D'autre part, les cultures sont utilisables à partir du 4e jour et jusqu'au 12e jour au moins.

La sécurité et l'efficacité de la méthode sont également remarquables. L'inoculation de la culture chauffée et l'inoculation consécutive de la culture normale ne provoquent aucune réaction; elles peuvent être pratiquées sur le tronc, sous la peau ou dans les masses musculaires. Les sujets vaccinés résistent et restent indifférents à l'épreuve la plus sévère.

On peut prévoir qu'il serait facile de réaliser avec cette méthode la vaccination par une seule inoculation et d'obtenir par là une amélioration considérable. L'inoculation de la culture chauffée confère une résistance très marquée, puisqu'elle permet aux animaux de supporter sans la moindre réaction l'injection d'une culture pure qui tue le témoin; peut-être

serait-elle pratiquement suffisante pour assurer la résistance au charbon accidentel. L'absence complète de réaction chez les vaccinés montre d'ailleurs que l'on pourrait inoculer d'emblée un virus plus actif que la culture chauffée à 70° pendant deux heures. En graduant la durée et l'intensité du chauffage, on créera toute une « échelle de virulence », dans laquelle on choisira un virus d'activité convenable pour les bovidés.

Sur tous ces points d'application, des études complémentaires sont nécessaires; leur programme peut être facilement prévu. L'intérêt pratique qui s'attache à leur réalisation nous fait désirer qu'elles puissent être bientôt entreprises.

III

IMMUNISATION PAR LE SÉRUM

Les premières tentatives de sérothérapie sont réalisées par Kitt, dès 1893 [1]. Un mouton vacciné qui reçoit trois inoculations successives avec 2 c. c. 1/2 de jus de muscles virulent donne un sérum qui, injecté à un autre mouton, sous la peau, à la dose de 40 c. c., le protège contre une inoculation virulente massive (2 c. c. 1/2 de jus de muscles). Duenschmann [2] montre que le sérum des lapins qui ont été inoculés à diverses reprises avec le *Bac. Chauvæi* possède des propriétés préventives; mélangé avec une forte dose de virus, il empêche l'action de celui-ci.

Kitt [3], en 1899, étudie spécialement la sérothérapie du charbon symptomatique. Il résulte de ses recherches que le cheval, le mouton, la chèvre et le bœuf, traités par des inoculations virulentes intra-veineuses ou sous-cutanées, donnent un sérum immunisant à l'égard du mouton. Le cheval et le mouton constituent les sujets de choix pour l'obtention rapide du sérum. Après quelques injections intra-veineuses, puis sous-cutanées, le sérum des sujets traités préserve le mouton à la dose de 5-10 c. c., contre une inoculation virulente pratiquée 3-8 jours

1. Kitt, Ueber Rauschbrandschutzimpfung mit Reinculturen. (*Monatshefte für prakt. Thierheilkunde,* t. V, 1893, p. 49.)
2. Duenschmann, Étude expérimentale sur le charbon symptomatique. (Ces *Annales*, t. VIII, 1894, p. 403.)
3. Kitt, Serumimpfung gegen Rauschbrand. (*Monatshefte für prak. Thierheilkunde,* t. XI, 1899, p. 49.)

plus tard. Chez une chèvre présentant des symptômes très graves à la suite de la pénétration du virus dans le tissu conjonctif sous-cutané, pendant une inoculation intra-veineuse, l'injection de 15 c. c. de sérum permet d'enrayer l'infection en quelques heures et elle assure la guérison [1]. Les moutons qui ont reçu successivement les inoculations de sérum et de virus possèdent une immunité active durable, et l'emploi combiné du sérum et du virus apparaît ainsi comme un procédé susceptible d'être appliqué pratiquement.

Arloing [2] confirme les résultats obtenus par Kitt; il obtient chez la génisse un sérum immunisant : l'injection préventive du sérum ne procure qu'une résistance passagère ; l'inoculation du mélange sérum-virus confère une immunité insuffisante. M. Arloing rapproche ces résultats de ceux obtenus antérieurement pour le rouget, la fièvre aphteuse, la rage, la péripneumonie ; mais il a certainement ignoré une étude publiée par l'un de nous en 1898, signalant déjà, pour une infection toute voisine du charbon symptomatique — la septicémie gangréneuse, — tous les faits essentiels apportés depuis [3].

A. — Production d'un sérum immunisant

Les recherches expérimentales que nous publions ici comprennent deux séries d'expériences.

1re *série*, 1896. — Une chèvre immunisée par une injection intra-veineuse virulente reçoit, pendant six mois (juillet 1896 à janvier 1897), des inoculations sous-cutanées de macération de muscles provenant de cobayes infectés. Les premières inoculations provoquent le développement de tuméfactions étendues avec phénomènes graves, les autres ne déterminent plus aucune réaction.

1. C'est à tort que M. Arloing dénie toute propriété curative aux sérums produits par Kitt, l'expérience rapportée à la page 56 des *Monatshefte* (1899) est probante à cet égard.

2. Arloing, Etude sur la sérothérapie du charbon symptomatique (*C. R. de l'Académie des Sciences*, 26 février 1900, et *Société des Sciences vétér. de Lyon*, 4 février 1900, p. 19). De l'immunité contre le charbon symptomatique... (*C. R. de l'Académie des Sciences*, 9 avril 1900, p. 991, et *Société des Sciences vétér. de Lyon*, 25 mai 1900, p. 95).

3. Leclainche, *La sérothérapie de la gangrène gazeuse*. (*Archives médicales de Toulouse*, 1898, p. 397.)

Le sérum de la chèvre acquiert très vite des propriétés immunisantes. Après trois inoculations, pratiquées à 10 jours d'intervalle, de 5. 10 et 15 c. c. de macérations broyées et filtrées de muscles de cobayes (poids égal de muscles et d'eau bouillie), on obtient un sérum qui protège le cobaye, à la dose de 1 à 5 c. c. contre une inoculation de 1/2 c. c. de macération virulente, pratiquée après un, deux ou trois jours. L'inoculation du mélange sérum-virus est inoffensive. Par contre, les inoculations simultanées, en des points différents, du sérum et du virus tuent dans le même temps que l'inoculation du virus seul; à plus forte raison les injections de sérum chez les cobayes qui ont reçu le virus n'empêchent ni ne retardent l'évolution. Les animaux traités par les mélanges sérum-virus, ou par les inoculations successives de sérum puis de virus, n'ont pas acquis d'immunité: presque tous succombent après 12 à 15 jours, considérablement amaigris et sans trace d'infection par la bactérie du charbon. Ils meurent intoxiqués, et les injections répétées de sérum sont impuissantes à empêcher l'amaigrissement et la mort.

L'épreuve des cobayes par les jus virulents expose à des accidents fréquents résultant surtout d'une invasion par le vibrion septique; les résultats acquis montrent à l'évidence que l'on ne saurait opérer à coup sûr qu'avec un virus pur, tel qu'il peut être obtenu seulement par la culture ou avec des jus virulents provenant d'animaux tués avec une culture.

2e *série*. — En possession de cultures virulentes pures du *Bact. Chauvœi*, nous avons repris, en 1899, l'étude de la sérothérapie. Deux chevaux sont mis en traitement; immunisés par l'injection intra-veineuse de cultures pures, ils sont traités ensuite par des injections intra-veineuses, pratiquées pour l'un avec des sérosités et des jus virulents, pour l'autre avec des cultures pures en bouillon Martin.

CHEVAL A. — JUS VIRULENTS.

Jour de l'expérience.									
1er	10 c. c. culture.								
14e	5	—	sérosité et jus dilués dans			45 c. c. eau bouillie.			
19e	15	—	—	—	—	50	—	—	
22e	50	—	—	—	—	150	—	—	
31e	35	—	—	—	—	150	—	—	

Les sérosités et jus injectés dans la jugulaire proviennent

des lésions musculaires de cobayes et de lapins tués avec des cultures additionnées d'acide lactique. Les premières injections ne déterminent pas d'accidents graves; par contre, la dernière provoque des troubles immédiats; l'animal tombe sur le sol, l'essoufflement est extrême; on constate de la chorée du diaphragme. Ces accidents disparaissent, mais l'état général est profondément altéré. Le cheval maigrit; la faiblesse est croissante; dix jours après la dernière inoculation, il tombe sur le sol et il doit être sacrifié.

Cheval B. — Cultures.

Jour de l'expérience.	Quantité injectée.	Age de la culture.
1er	20 c. c.	5 jours.
5e	36 —	8 —
13e	50 —	4 —
18e	45 —	5 —
21e	55 —	4 —
24e	130 —	6 —
33e	110 —	5 —
41e	95 —	6 —
65e	120 —	8 —
109e	60 —	3 —
118e	135 —	5 —

On ne constate que des accidents immédiats d'intoxication passagère sans gravité.

Le cheval a reçu au total, en quatre mois, 850 c. c. de cultures très virulentes.

B. — Procédés de l'immunisation.

Le mouton apparaît comme le réactif de choix pour l'épreuve des sérums, et Kitt proclame sa supériorité. L'emploi du cobaye complique, en effet, l'expérimentation; mais les difficultés qui résultent de son utilisation ne diminuent en rien la signification des résultats, et l'analyse des irrégularités observées permet parfois d'intéressantes constatations. Le nombre considérable des expériences à réaliser nous interdisant l'épreuve par le mouton, c'est avec le cobaye que toutes nos recherches ont été poursuivies.

On constate des différences marquées dans la réceptivité des cobayes; celles-ci sont liées notamment à l'âge et à la race des animaux. Il importe, pour obtenir des résultats précis, d'employer, dans chaque série, des animaux de même âge et,

autant que possible, de même origine. L'emploi de doses trop fortes de virus expose aussi à des accidents; il convient de ne pas dépasser sensiblement les doses sûrement mortelles. On inoculera au cobaye le jus virulent extrait des tumeurs à la dose d'une goutte; pour les cultures, on ne dépassera pas une dose de cinq gouttes.

On peut étudier successivement les propriétés *préventives* des sérums, les résultats de l'inoculation des *mélanges sérum-virus*, et enfin les *effets curatifs* des sérums sur les animaux infectés.

I. *Immunisation préventive.* — L'injection sous-cutanée de sérum assure l'immunisation des organismes; elle leur permet de supporter sans dommage une inoculation virulente consécutive.

Le cheval et la chèvre nous ont donné rapidement des sérums immunisant, à des doses de 5 à 1 c. c., des cobayes de 200 à 700 grammes.

Exp. — Trois cobayes reçoivent sous la peau du cou une injection de sérum provenant d'une chèvre ayant reçu en deux mois 54 c. c. de jus de muscles virulents dilués avec deux fois leur volume d'eau bouillie.

Cobaye *a*.	230 grammes.	3 c. c. de sérum.
— *b*.	200 —	2 — —
— *c*.	250 —	1 — —

24 heures après les animaux reçoivent dans les muscles de la cuisse une goutte d'un jus virulent qui tue le témoin en 20 heures. Tous résistent à l'épreuve. Accidents locaux insignifiants.

Exp. — Deux cobayes reçoivent, sous la peau du cou, du sérum provenant du cheval B, traité par les cultures pures.

Cob. 434; 210 gr. 1 c. c. de sérum.
Cob. 434 *bis*, 850 gr. 2 c. c. de sérum.

Éprouvés 24 heures après avec 4 gouttes de culture dans la cuisse, ils restent indemnes, tandis que le témoin meurt en 18 heures.

Ces résultats sont obtenus indifféremment avec les sérums de la chèvre et des chevaux traités.

Il s'en faut que la certitude de l'immunisation préventive soit en rapport direct avec la quantité du sérum injecté. Ainsi qu'on l'observe pour divers autres virus, il arrive souvent qu'une faible dose de sérum protège alors qu'une dose deux fois plus élevée se montre inefficace.

Parmi les animaux éprouvés, certains résistent indéfiniment sans présenter aucun symptôme; d'autres succombent, très

amaigris, cachectiques, 15-30 jours environ après l'insertion virulente.

L'imprégnation immunisante s'établit assez lentement. Les animaux ne sont nullement protégés alors que l'inoculation virulente est pratiquée deux heures après celle du sérum ; après 4-8-10 heures la prévention est encore incertaine ; après 12 heures seulement, l'état réfractaire est sûrement constaté.

L'immunité due au sérum est peu durable ; en aucun cas, elle ne dépasse 8 jours.

II. *Immunisation par les mélanges sérum-virus.* — Une dose mortelle de virus, mélangée à une faible quantité d'un sérum immunisant, est neutralisée dans ses effets. On peut opérer indifféremment avec des produits organiques ou avec des cultures virulentes, à cette condition de ne pas employer des doses massives de virus.

Exp. — 9 IX 96. — Sept cobayes reçoivent chacun, dans les muscles de la cuisse, 5 centigrammes de poudre virulente diluée dans 1 c. c. de sérum de chèvre immunisée. Tous restent indemnes.

Un témoin qui reçoit 2 centigrammes de la même poudre, diluée dans du bouillon, meurt en 36 heures.

Exp. — Plusieurs séries de cobayes reçoivent du jus de muscles ou de la culture virulente mélangés à du sérum provenant du cheval II.

Nous rapportons quelques-uns des résultats obtenus.

	Matière virulente.		Quantité de	
Cobayes.	Origine.	Quantité.	sérum.	Résultat.
219	Culture.	5 gouttes.	3 c. c.	Survit.
220	—	—	—	—
246	—	3 gouttes.	2 c. c.	—
343	Sérosité.	2 gouttes.	5 c. c.	—
344	—	—	—	—
346	Culture.	3 gouttes.	2 c. c.	—
347	—	—	—	—
423	Sérosité.	1 goutte.	1/2 c. c.	—
424	—	—	1 c. c.	—
470	Jus de muscles.	1 goutte.	1/2 c. c.	—
483	—	—	—	—

Dans toutes les expériences, les témoins succombent en 12-18 heures.

Les doses trop fortes de virus sont difficilement neutralisées par le sérum.

Exp. — Cob. 440 ; 1 goutte jus virulent et 1/2 c. c. sérum. *Survit.*
Cob. 442 ; 2 gouttes jus et 1/2 c. c. sérum. *Mort en* 18 *heures.*
Cob. 444, *Témoin ;* 1 goutte jus. Mort en 18 heures.

Les cobayes qui ont résisté à l'inoculation du mélange sérum-virus ne possèdent pas d'immunité durable. Éprouvés par une inoculation virulente, à partir du dixième jour, ils sont tués aussi sûrement et aussi vite que les témoins.

III. *Action curative exercée par le sérum.* — L'inoculation simultanée, en des points différents, du virus et du sérum, n'assure point la résistance chez le cobaye. On ne constate qu'une légère survie des traités.

Dans les expériences rapportées ici comme exemple, les animaux reçoivent en même temps le virus dans la cuisse et le sérum sous la peau du cou.

Cobayes.	Sérum.	Virus.	Durée de l'évolution.	Témoin mort en
F.5	5 c. c. chèvre.	1 goutte jus.	36 heures.	24 heures.
313	5 c. c. cheval.	3 gouttes culture.	18 —	16 —
314	—	—	28 —	—
315	10 c. c. cheval.	—	23 —	—

L'inoculation du sérum dans le péritoine ne modifie point le résultat de l'intervention.

Exp. — Deux cobayes inoculés dans la cuisse, avec 2 gouttes de jus virulent, reçoivent en même temps 5 c. c. de sérum de cheval dans le péritoine; ils sont tués en 15 et 18 heures. Le témoin meurt en 16 heures.

Ainsi qu'on peut le prévoir, les injections de sérum sont impuissantes à enrayer, chez les cobayes, à quelque dose que ce soit, les effets d'une inoculation pratiquée antérieurement.

C. — Propriétés agglutinantes du sérum.

Il est indiqué d'employer pour l'étude des cultures âgées de 24 heures environ.

Un sérum indifférent, provenant du cheval ou du bœuf, n'agglutine pas à 1 : 12, tandis que le sérum du cheval immunisé provoque une agglutination immédiate à des proportions comprises entre 1 : 30 et 1 : 3,000. Une agglutination plus lente, mais encore très nette, est obtenue à des taux variant entre 1 : 3,000 et 1 : 6,000.

Un sérum provenant d'une vache affectée de charbon expérimental agglutine à 1 : 300 après 18 heures seulement, alors que les sérums de deux vaches vaccinées avec des cultures pures agglutinent au même taux en moins de 12 heures.

Les propriétés agglutinantes paraissent rigoureusement spécifiques. Le sérum d'un âne fortement immunisé contre le vibrion septique ne donne aucune agglutination à 1 : 10.

D. — Application de la sérothérapie.

Les résultats obtenus chez le cobaye ne sauraient être étendus à d'autres espèces. L'immunité s'établit ou non selon que la phagocytose, plus ou moins rapide, permet ou non une évolution virulente vaccinale.

L'action préventive est constatée chez toutes les espèces. Kitt immunise préventivement le mouton avec 10 et 5 c. c. de sérum contre l'inoculation, pratiquée quelques jours plus tard, de 4 gouttes de jus virulent. Arloing constate les mêmes faits et obtient aussi l'immunisation du bœuf dans deux expériences sur quatre.

Alors que, chez le cobaye, les inoculations successives de sérum, puis du virus, n'assurent pas une immunité durable, il en est autrement pour d'autres espèces. Kitt a démontré nettement que les moutons immunisés par le sérum, et inoculés quelques jours plus tard avec le virus, acquièrent une immunité solide et durable; ils résistent complètement à une inoculation virulente, sévère, pratiquée après un ou deux mois. Dans la conclusion de son beau travail sur la sérothérapie, Kitt formule cette opinion que cette méthode d'immunisation pourrait avoir une valeur pratique et qu'en tout cas, combinée avec la vaccination par les virus affaiblis, elle permettrait d'en diminuer les dangers.

Après avoir répété, avec les mêmes résultats, les expériences de Kitt sur le mouton, M. Arloing a réalisé quelques essais chez le bœuf. « L'inoculation successive du sérum et de la sérosité virulente procure au bœuf l'immunité que j'ai obtenue sur le mouton. Mais, pour obtenir ce résultat, il faut que la dose de sérum soit voisine de 25 c. c. si on l'injecte sous la peau, et de 10 c. c. si on l'injecte dans le sang chez de jeunes bovidés de 15 à 18 mois. »

De même que chez le cobaye, les inoculations du mélange sérum-virus ne confèrent pas l'immunité au mouton. M. Arloing constate que les moutons inoculés résistent, mais qu'ils ne pos-

sèdent pas d'immunité durable. Deux bovidés jeunes, qui reçoivent un mélange de 1 et 1/2 c. c. de sérum avec 1/5 de c. c. de virus frais, ne présentent aucune réaction. Inoculés ensuite avec 1/4 de c. c. de virus frais, les animaux présentent des abcès profonds, sans modification de l'état général. Le peu de sévérité de cette dernière épreuve, suivie d'ailleurs d'accidents locaux, n'autorise pas à conclure que l'immunisation par le mélange sérum-virus s'opère mieux chez les bovidés que chez les autres espèces.

L'action curative du sérum, impossible à vérifier chez le cobaye, en raison de la rapidité de l'évolution, est mise en évidence par Kitt sur la chèvre, sur le mouton et sur le bœuf, lors d'évolution ralentie. M. Arloing l'étudie chez le mouton et chez le bœuf : chez le mouton, il est possible d'enrayer l'infection par une injection de sérum pratiquée après 3 ou 4 heures dans le tissu conjonctif ou après 9 à 10 heures par la voie sanguine ; chez les bovidés, les injections répétées de sérum se sont montrées insuffisantes après 8 heures.

En somme, les applications de la sérothérapie paraissent devoir rester très limitées.

Comme méthode d'immunisation rapide, le sérum pourra être employé en quelques circonstances exceptionnelles. Alors que le charbon sévit à l'état enzootique, il serait indiqué d'injecter les animaux exposés à l'infection pour les soumettre quelques jours plus tard à la vaccination.

La méthode d'immunisation durable par l'emploi successif du sérum et du virus n'a point donné jusqu'ici chez les bovidés de résultats définitifs. Ses inconvénients sont évidents *a priori* : On ne peut employer, pour l'inoculation virulente, des jus de muscles ou des poudres, toujours impurs ; d'où l'obligation de recourir aux cultures. D'autre part, le procédé nécessite deux inoculations et l'amélioration tant souhaitée d'une intervention unique n'est pas réalisable.

Quant à l'utilisation des propriétés curatives du sérum, elle pourra être tentée dans les formes à évolution ralentie du charbon accidentel.

CONCLUSIONS

I. — Les vaccins pulvérulents préparés suivant la méthode de MM. Arloing et Cornevin ne sont nullement « atténués » ; ils renferment des spores non modifiées ; leurs propriétés spéciales sont dues à une altération de la toxine sous l'influence de la chaleur. L'évolution vaccinale est expliquée par la présence de particules solides et de microbes associés qui enrayent l'action phagocytaire.

II. — Il est possible de préparer des vaccins pulvérulents purs.

III. — La vaccination est réalisée, chez les bovidés, par l'inoculation de cultures pures chauffées à 70° pendant deux heures. L'immunité conférée peut être complétée par l'inoculation d'une culture pure non chauffée.

Les animaux ainsi traités supportent sans réaction des doses massives de jus virulents.

La méthode est susceptible d'être utilisée dans la pratique.

IV. — Le cheval et la chèvre traités par des injections répétées, dans les veines, de jus ou de cultures virulents, donnent un sérum immunisant.

V. — Le sérum est doué de propriétés préventives ; il ne confère qu'une immunité passagère. Mélangé au virus, le sérum en neutralise les effets, chez le cobaye, sans conférer d'immunité persistante.

VI. — Au point de vue pratique, la sérothérapie ne comporte que des indications restreintes. L'utilisation des virus purs permettra sans doute de réaliser la vaccination par une seule inoculation ; elle paraît devoir constituer la méthode de choix en raison de sa sécurité et de sa simplicité.

LE BACILLE PISCIAIRE

et la tuberculose de la grenouille due à ce bacille,

Par le Dr LEDOUX-LEBARD

MM. Bataillon, Dubard et Terre[1] ont découvert, en 1897, une nouvelle espèce de tuberculose se développant chez les carpes, et due à un bacille (*Bacillus tuberculosis piscium*) qui présente la réaction colorante du bacille aviaire, dont il se distingue par ce double caractère qu'il ne donne la tuberculose ni au cobaye ni à l'oiseau, et qu'il pousse à la température ordinaire. Les propriétés de ce bacille lui donnent rang à côté des tuberculoses humaine et aviaire. La persistance de la coloration du bacille pisciaire en présence des acides dilués n'est pas son seul trait de ressemblance avec les autres bacilles offrant la même réaction. L'aspect de ses cultures sur les différents milieux rappelle, comme on sait, celui des cultures de bacille de Koch et du bacille aviaire, et il ne serait pas facile de différencier ces microbes si l'on ignorait à quelle température s'est effectué le développement.

Cette analogie se poursuit si l'on étudie la structure des colonies. Les préparations de cultures en gouttes pendantes séchées à l'étuve, fixées à l'alcool, colorées, permettent de constater les caractères que nous avons étudiés en détail, pour le bacille aviaire et le bacille de Koch, dans un précédent mémoire[2].

Les bacilles se groupent en filaments le long desquels ils se disposent les uns par rapport aux autres comme les bacilles du cladothrix. (Fig. 1, pl. V.)

Les filaments présentent de fausses ramifications. Ils se groupent en faisceaux et forment un réseau à mailles de plus en plus étroites à mesure que la culture se développe. Nous avons observé la même loi de formation des colonies pour le

1. *Soc de biol*, 8 mai 1897.
2. *Arch. de méd. exp. et d'an. path*, mai 1898.

bacille de la Fléole (*Timothecbacillus de Moëller*) qui présente aussi la réaction colorante du bacille de Koch. En dehors du genre *sclerothix* auquel appartiennent ces différents bacilles, nous ne connaissons pas actuellement de colonies pareillement édifiées.

Cette communauté de caractères s'étend-elle aux qualités des toxines sécrétées par les bacilles ou extraites de leur substance, et, en particulier, peut-on assimiler la tuberculine pisciaire à la tuberculine de Koch?

D'après MM. Ramont et Ravaut,[1] « le bacille de la tuberculose des poissons sécrète une toxine dont les propriétés sont analogues, en grande partie, à celles de la tuberculine extraite des cultures en bouillon du bacille de Koch. » Cette conclusion s'étaye en partie sur les résultats d'une expérience dans laquelle un cobaye tuberculeux a réagi par une courte élévation de température contre l'inoculation de tuberculine pisciaire qui n'avait pas été réduite au dixième de son volume primitif.

Cette observation serait plus instructive si, au degré atteint par la température, on avait joint l'étude de la courbe thermique pendant les heures qui suivent l'injection de la tuberculine, et comparé, dans les mêmes conditions, l'action des tuberculines.

Nous avons fait sur ce point des expériences portant sur 12 cobayes inoculés dans le péritoine avec une culture de bacilles de Koch, âgée de moins d'un mois. Ces cobayes ont servi aux essais comparatifs des tuberculines, pendant les troisième et quatrième semaines après l'inoculation.

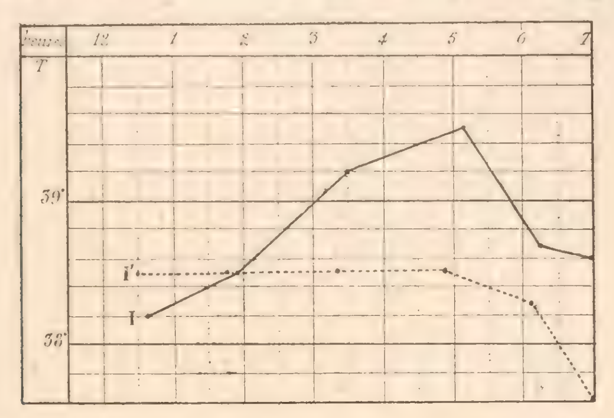
Tuberculine de Koch et tuberculine pisciaire avaient été préparées à l'aide de cultures à développement aussi égal que possible, ayant poussé dans des ballons contenant le même milieu et le même volume de liquide. Nous avons essayé comparativement des tuberculines préparées soit avec des cultures en bouillon peptonisé, salé, glycériné et additionné de fragments de pommes de terre, soit avec des cultures dans la simple macération aqueuse glycérinée de pommes de terre. La proportion de glycérine n'était que de 2 0/0. La tuberculine est peut-être alors moins active, mais on élimine en partie l'action toxique de la glycérine signalée par Straus. Les cultures étaient

1. Sur une nouvelle tuberculine. *Soc de biol.*, 28 mai 1898.

réduites au dixième de leur volume, dans un bain-marie à 100°, puis filtrées sur papier.

Voici, en résumé, les résultats obtenus :

1° A la dose de 0,2 c. c., la tuberculine pisciaire n'a pas produit de réaction sensible chez un cobaye de 425 grammes

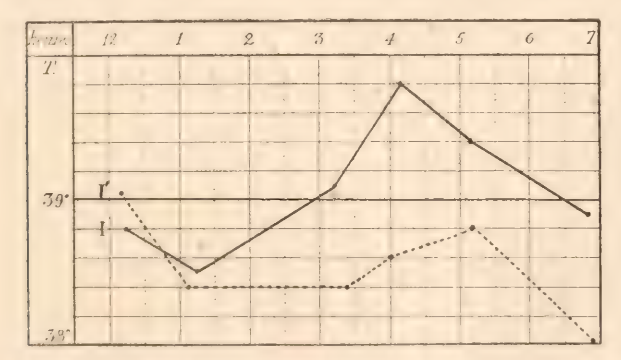


Tracé 1. — I. Cob. n° 1, 410 gr., inoc. dans le péritoine avec une cult. de bacilles de Kock, il y a 19 jours. Injecté sous la peau avec 0,2 c. c. de tuberculine de Koch, à 12 h. 40.

I'. Cob. n° 2, 425 gr., inoc. comme le précédent, il y a 19 jours. Injecté sous la peau avec 0,2 c. c. de tuberculine pisciaire, à 12 h. 30.

tuberculisé depuis 19 jours. (Tracé 1. Courbe I'. Le point I' correspond à l'heure de l'injection et indique la température du cobaye un peu avant l'injection.)

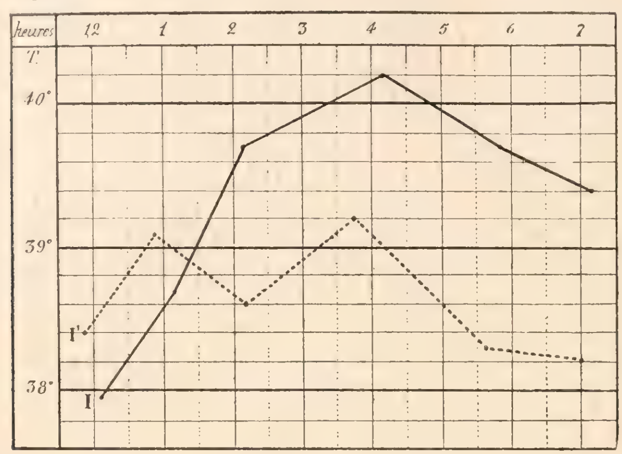
La même dose de 0,2 c. c. de tuberculine de Koch, injectée



Tracé 2. — I. Cob. n° 1 injecté sous la peau avec 0,5 c. c. de tuberculine de Koch, 2 jours après la première injection.

I'. Cob. n° 2, injecté sous la peau avec 0,5 c. c. de tuberculine pisciaire, 2 jours après la première injection.

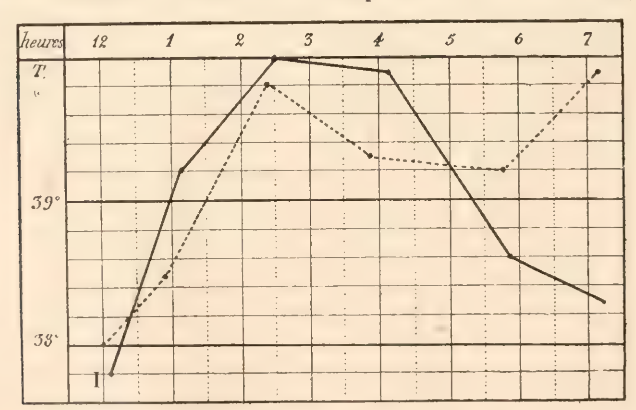
à un cobaye de 440 grammes tuberculisé dans les mêmes conditions que le précédent, a provoqué une ascension de température après l'injection. (Tracé 4, courbe I. Le point I a la même signification que I'.)



Tracé 3. — I. Cob. nº 3, 340 gr., inoc. dans le péritoine avec une cult. de bacilles de Koch, il y a 18 jours. Injecté sous la peau avec 0,5 c. c. de tuberculine de Koch, à 12 h. 5.

I'. Cob. nº 4, 340 gr., inoc. comme le précédent, il y a 18 jours. Injecté sous la peau avec 0,5 c. c. de tuberculine pisciaire, à 11 h. 50.

Deux jours plus tard, les deux mêmes cobayes ont reçu : le premier 0,5 c. c. de tuberculine pisciaire, le second 0,5 c. c.



Tracé 4. — I. Cob. nº 5, 310 gr., inoc. comme les deux précédents, il y a 18 jours. Injecté sous la peau avec 0,4 c. c. de tuberculine de Koch, à 12 h. 10.

I'. Cob. nº 6, 430 gr., inoc. comme les trois précédents, il y a 18 jours. Injecté sous la peau avec 0,5 c. c. de tuberculine pisciaire, à 11 h. 55.

de tuberculine de Koch. Seul, ce dernier a présenté une élévation de température, trois heures après l'injection. (Tracé 2.)

2° En débutant par des doses fortes (0,5 c. c.), nous avons obtenu des élévations de température peu différentes avec l'une et l'autre tuberculine. Néanmoins, le maximum était un peu plus élevé avec la tuberculine de Koch, et la courbe thermique s'élevait à partir de la deuxième heure après l'injection, se maintenait élevée pendant trois heures, pour s'abaisser ensuite progressivement.

Avec la tuberculine pisciaire, plusieurs fois la variation de température s'est montrée beaucoup moins régulière, et la courbe, au lieu d'être représentée dans sa portion culminante par une ligne convexe vers le haut, offrait des oscillations de près d'un degré. (Voir les tracés 3 et 4.)

Ces différences ont été observées chez des cobayes traités, les uns avec la tuberculine pisciaire, les autres avec la tuberculine de Koch, et aussi chez un même cobaye traité d'abord avec la tuberculine prisciaire et, trois jours après, avec la même dose de tuberculine de Koch, ou bien encore chez un autre cobaye traité d'abord avec la tuberculine de Koch et, trois jours après, avec même dose de tuberculine pisciaire.

3° A la dose très forte de 1 c. c., la tuberculine de Koch a tué en 5 heures 1/2 un cobaye de 500 grammes, tuberculisé depuis 28 jours. Le cobaye témoin, de 510 grammes, injecté avec 1 c. c. de tuberculine pisciaire, a présenté la même élévation de température que le précédent, mais a survécu pendant plusieurs semaines.

D'une manière générale, la tuberculine pisciaire s'est donc montrée, dans nos expériences, moins active que la tuberculine de Koch, comme agent thermogène.

Ajoutons que la tuberculose pisciaire, injectée dans le sac lymphatique dorsal d'une grenouille (*R. esculenta*), tuberculisée depuis 29 jours avec le bacille de Dubard, n'a pas provoqué la mort à la dose de 0,1 c. c., puis de 0,3 c. c. trois jours après la première injection. Cette dernière dose, correspondant à 3 c. c. de bouillon de culture, est relativement énorme pour un animal de cette taille.

II

LA TUBERCULOSE DE LA GRENOUILLE. — ANATOMIE PATHOLOGIQUE

On n'a encore observé la tuberculose spontanée par le bacille pisciaire que chez les carpes. Mais d'autres espèces animales peuvent être infectées par le bacille de la tuberculose des poissons. D'après M. Dubard[1], « carpes, cyprins divers, tritons, grenouilles, crapauds, tortues, lézards, seps, orvets, couleuvres et vipères prennent cette tuberculose ». Nous avons surtout étudié son évolution chez la grenouille.

Bien que nous ayons autopsié un assez grand nombre de ces animaux, nous n'avons jamais observé de tuberculose spontanée.

Technique. — Nous mettions les grenouilles dans de larges bocaux recouverts d'une mousseline solide maintenue par un tour de ficelle au-dessous du rebord du bocal et, autant que possible, une seule grenouille dans chaque bocal. L'eau formait une couche de quelques centimètres d'épaisseur; elle était remplacée, chaque jour, par de l'eau sensiblement à la même température.

Les grenouilles étaient nourries environ une fois chaque semaine par gavage, avec du filet de bœuf, de la viande de veau ou des vers de vase. Grâce à ces soins faciles, les grenouilles vertes, mises dans la chambre étuve à 35° dans une demi-obscurité, pouvaient y être maintenues pendant plus d'un mois.

La technique histologique suivie dans les différentes recherches qui vont être exposées se compose des procédés classiques.

Après l'inoculation du bacille pisciaire dans le sac lymphatique dorsal de la grenouille, celle-ci conserve pendant un certain temps les apparences de la santé, puis elle maigrit d'une manière progressive ; ses membres postérieurs s'atrophient, elle ne saute plus, elle marche, elle nage lentement, elle perd ses forces et son agilité : parfois des ulcérations sanguinolentes se produisent sur les téguments ; l'eau du bocal où elle se trouve, quoique renouvelée, s'altère rapidement. La grenouille meurt et l'on peut dire qu'elle meurt de phtisie. Cette période consomptive fait souvent défaut, surtout dans les formes à marche rapide. Alors, sans amaigrissement notable, l'animal peut mourir après des convulsions qui rappellent celles du strychnisme.

1. La tuberculose des animaux à sang froid. *Rev. de la tuberculose*, 1898, p. 13.

La mort survient au bout d'un temps variable de quelques semaines à plusieurs mois.

Nous nous sommes servi, pour nos expériences, de la grenouille verte (*R. esculenta*) et de la grenouille rousse (*R. temporaria.*) La grenouille rousse nous paraît beaucoup plus sensible, et c'est dans cette espèce que nous avons rencontré le plus souvent des formes de tuberculose à végétation bacillaire luxuriante.

A l'autopsie, on peut ne découvrir aucune lésion macroscopique comme il arrive dans les formes à marche rapide. S'il y a des lésions, c'est dans le foie et les reins qu'on les observe le plus fréquemment. Le foie est semé d'innombrables petites taches d'un blanc grisâtre (granulations grises) ayant d'un à quelques dixièmes de millimètre de diamètre et presque confluentes. A la surface des reins, il y a aussi des tubercules. Les plus gros atteignent presque le volume d'un grain de mil ; on en compte seulement quelques-uns, ou bien la surface des reins en est couverte et prend un aspect granuleux. La rate est hypertrophiée. Les poumons paraissent sains. Notons un seul cas de péricardite tuberculeuse, avec adhérences des feuillets du péricarde.

C'est dans le foie, de préférence, que nous étudierons les lésions tuberculeuses. Celles-ci apparaissent souvent sur les coupes du foie colorées par le Ziehl et l'hématoxyline, comme des îlots blanchâtres semés çà et là au milieu du parenchyme hépatique. Cette apparence est due à ce que, dans ces îlots, le protoplasme des cellules hépatiques n'est pas coloré par l'hématoxyline en violet pâle comme celui des cellules normales. Les noyaux de ces cellules incolores continuent à fixer la matière colorante, ou bien ils se fractionnent en masses irrégulières sans grains de chromatine distincts, ou enfin ils disparaissent, en sorte que la cellule tout entière, noyaux et protoplasme, reste incolore.

Ce sont là les caractères de la nécrose cellulaire. Les travées résultant de l'assemblage de ces cellules dégénérées forment les nodules de nécrose, dont la coupe est l'îlot blanchâtre qu'on vient de voir. Sur ce fond incolore tranchent la teinte violacée des noyaux qui ont échappé à la destruction et les traits rouges et déliés des bacilles colorés par la fuchsine. Ces der-

niers, libres ou inclus dans les cellules, isolés ou en amas, sont disséminés parmi les éléments dégénérés.

Le nodule de nécrose se continue avec le parenchyme sain par une surface nettement tranchée, ou même il tend à s'en séparer comme un séquestre. Il se rétracte probablement sous l'influence des réactifs, et, sur la coupe, l'îlot de nécrose est alors séparé du tissu sain par un espace vide que traversent, de distance en distance, les fragiles travées persistantes. La fig. 2, Pl. V, qui s'applique à la lésion qui va suivre, reproduit aussi ce mode de séparation du tissu malade et du tissu sain.

Cette nécrose du tissu hépatique est la lésion primaire. Elle s'accompagne souvent d'une réaction caractérisée par l'apparition de cellules, plus ou moins nombreuses, à l'endroit de l'altération.

Cet amas de cellules constitue le follicule tuberculeux. Tandis que la coloration simple à l'hématoxyline met en évidence les îlots de nécrose, mieux que la coloration double à l'hématoxyline-éosine, celle-ci est préférable pour l'étude du tubercule. L'éosine colore le protoplasme cellulaire, y compris celui des cellules hépatiques en voie de dégénérescence, et la lésion apparaît alors comme un amas d'éléments à noyau, entourés d'une couche de protoplasme plus ou moins épaisse, dont un certain nombre ont le type dit épithélioïde. Ces cellules épithélioïdes, du moins un certain nombre d'entre elles, sont représentées par les cellules hépatiques à l'état de nécrose incomplète, possèdant encore un noyau colorable. Nous n'avons jamais rencontré de cellules géantes. Mais à la périphérie du tubercule s'étalent assez souvent une ou plusieurs de ces cellules pigmentaires propres au foie de la grenouille. Nous y reviendrons plus loin. Enfin, le tubercule tend à se séparer des parties voisines, à se séquestrer comme le nodule de nécrose. La fig. 2, Pl. V, représente un tubercule du foie, mais avec des bacilles disposés en amas.

Le follicule tuberculeux et la dégénérescence des travées qui l'accompagne, peuvent être différemment associés. Cette dégénérescence peut dépasser les limites du foyer de prolifération, formant alors, sur les coupes, une zone circulaire d'aspect vitreux autour de chaque tubercule.

Enfin, il arrive que les follicules tuberculeux ou les tuber-

cules qui résultent de leur confluence subissent l'action nécrosante du bacille. Toute la masse, représentée par les travées hépatiques et les cellules accumulées, succombe à la dégénérescence et se caséifie. La matière caséeuse contient de nombreux bacilles plus ou moins colorés ou fragmentés. A la périphérie existe parfois une zone d'envahissement et de prolifération bacillaire, qui rappelle la zone semblable de la tuberculose zoogléique de Malassez (Fig. 3, Pl. V). La caséification est rare, nous n'en avons observé qu'un cas.

Nécrose, tubercules, caséification sont des lésions qu'on observe aussi bien dans la tuberculose des mammifères par le bacille de Koch. Elles justifient la dénomination de tuberculose donnée à la maladie que nous étudions. Les îlots de nécrose peuvent être la lésion dominante de la tuberculose hépatique chez la grenouille, mais cette prédominance peut s'observer dans la tuberculose de Koch. Dans le foie de cobaye mort de tuberculose expérimentale (B. de Koch), nous avons souvent cherché en vain les lésions du tubercule classique, tandis que le parenchyme était semé de zones dégénérées, et déjà, en 1891, Pillet[1] insistait sur l'importance trop méconnue des lésions dégénératives.

Le bacille pisciaire est donc capable de produire la dégénérescence caséeuse tout comme le bacille de Koch, le bacille aviaire, le bacille de Malassez; c'est un nouvel exemple à invoquer contre la spécificité de cette lésion.

On vient de voir que le bacille de Dubard et le bacille de Koch produisent des lésions de même ordre. Après les analogies, montrons les différences, et étudions maintenant les caractères spéciaux à la tuberculose par le bacille pisciaire. Ils ont trait, non pas à la lésion histologique, mais au mode de développement du bacille.

Le bacille pisciaire ne se présente pas toujours en faibles amas disséminés comme dans les cas précédents. Dans certaines formes de tuberculose on voit, au niveau des régions atteintes, de nombreuses cellules remplies de bacilles, au point que souvent leur protoplasme est réduit à une mince

1. Étude d'histologie pathologique sur la tuberculose expérimentale et spontanée du foie. Thèse de Paris, 1891.

enveloppe qui, pressant de tous côtés l'amas microbien, lui donne l'aspect d'une boule sphérique ou ovoïde, tandis que le noyau de la cellule, rejeté latéralement, apparaît comme un croissant. On ne distingue pas toujours de couche protoplasmique ou de noyau appliqués sur les masses bacillaires, dont la forme régulière fait supposer qu'elles se sont libérées de leur enveloppe; elles peuvent être encore plus volumineuses, occuper la lumière d'un capillaire et se mouler sur ses parois. Les amas bacillaires siègent dans les tubercules; ils occupent de préférence la périphérie de la lésion; ils forment, en se rapprochant ou en confluant, cette zone d'accroissement que nous avons signalée autour des tubercules caséeux; teints en rouge par le Ziehl sur les coupes colorées à l'hématoxyline, teints en violet par le Gram sur les coupes colorées au picro-carmin, ils donnent aux tubercules une apparence tachetée, visible à de faibles grossissements, et que nous n'avions jamais rencontrée dans la tuberculose de Koch, (fig. 2. et 4 pl. V).

La prolifération du bacille peut être encore plus active. Il ne reste plus limité à l'intérieur des cellules distendues par ses amas, mais il pousse en formant d'épais faisceaux à la surface des travées hépatiques dont il cause la mort. Les cellules nécrosées peuvent conserver assez de leur substance, souvent réduite à la cuticule, pour maintenir en place l'édifice des travées qui servent de support à la colonie parasitaire, dont les faisceaux ramifiés, ainsi soutenus, s'irradient dans les diverses directions de l'espace.

Ces végétations bacillaires, colorées par le Ziehl, se distinguent déjà à l'œil nu sur les coupes du foie. Examinées au microscope et lorsque leurs faisceaux n'ont pas été brisés ou dissociés par les manipulations, elles ont l'aspect et la structure des colonies développées en goutte pendante (Fig. 5, pl. V). A une période plus avancée de leur évolution, ces colonies se comportent comme celles des milieux artificiels, les mailles se comblent, les faisceaux deviennent indistincts et l'on voit au milieu du parenchyme hépatique d'énormes masses microbiennes sans structure distincte.

Nous avons observé 8 fois cette forme à colonies géantes.

Dans un de ces cas, il s'agissait d'une grenouille injectée avec une forte dose de tuberculine pisciaire, et morte 22 jours

après cette injection. C'est l'exemple cité plus haut de la résistance des grenouilles à la tuberculine. Nous voyons qu'à la dose indiquée et malgré cette résistance, la tuberculine n'a pas eu d'effet utile.

De plus, dans plusieurs de ces cas, la réaction cellulaire était faible ou presque nulle : peu ou point de cellules pénétrant dans les mailles de ses colonies, et, autour d'elles, peu ou point de cellules se rassemblant en rempart protecteur; en un mot pas de tubercules. Dans d'autres cas, la réaction cellulaire était assez prononcée.

Nous pouvons rapprocher de cette forme à colonies géantes, chez la grenouille, celle que nous avons observée chez le triton vulgaire inoculé avec le bacille pisciaire. Ici, les végétations intra-hépatiques n'étaient pas constituées par d'aussi épais faisceaux : elles étaient formées par un réseau très lâche de fils grêles, composés seulement de quelques filaments de bacilles s'étendant bien au-delà du champ du microscope. Autour de ces végétations, la multiplication cellulaire faisait souvent défaut, et les cellules hépatiques paraissaient avoir supporté sans en être lésées d'une façon appréciable le voisinage du bacille devenu ainsi un commensal toléré (Fig. 6, pl. V). L'existence dans les viscères de la grenouille de colonies géantes et, dans ceux du triton, de faisceaux grêles et ramifiés, suffit à démontrer le développement du bacille dans l'organisme de ces animaux.

En résumé, le bacille pisciaire se développe dans le foie de la grenouille en éléments ou faibles amas disséminés, en gros amas sphériques, en colonies géantes. Il produit, dans toutes ces formes, une dégénérescence du tissu dont la terminaison ultime est la nécrose, tandis que la réaction cellulaire représentée par le tubercule est variable, et semble d'autant moins prononcée que la prolifération bacillaire est plus active.

Il existe une remarquable uniformité dans les lésions hépatiques, et l'on peut leur appliquer cette conclusion du travail de MM. Brissaud et Toupet[1] sur la tuberculose du foie humain : « Dans chaque cas envisagé individuellement, la lésion tuberculeuse est presque toujours et presque partout identique à elle-même. » Mais ici, cette formule peut encore être généra-

1. *Sur la tuberculose du foie. Etudes exp. et clin. sur la Tuberculose,* Paris, 1887. p. 98.

lisée. D'abord, elle s'applique à la végétation bacillaire aussi bien qu'à la lésion histologique. S'il y a quelque part dans le foie des amas bacillaires sphériques, tous les foyers de bacilles ou presque tous présentent de tels amas: s'il y a une colonie géante, le foie est semé de colonies géantes. On comprend bien en effet que, dans le même parenchyme, des bacilles de même provenance donnent partout pareille poussée. Mais en outre, la même loi s'étend à d'autres organes, reins et rate, où la végétation du bacille affecte le même type que dans le foie.

Les poumons sont relativement épargnés. On y observe de faibles amas de bacilles. Cependant, nous y avons rencontré, dans un cas, des colonies géantes. En général, les bacilles y sont moins nombreux que dans le foie, la rate et les reins. Dans ces derniers organes, les tubercules siègent entre les tubuli. Ceux-ci paraissent opposer une solide résistance à l'envahissement. On trouve des tubuli intacts à la marge des tubercules, ou même en plein foyer tuberculeux (Fig. 7, pl. V).

Pour les tubercules du foie, la détermination des cellules logeant des amas de bacilles n'est pas possible, le plus souvent, à cause du grand nombre d'éléments juxtaposés. Dans les reins, on reconnaît facilement, occupant les espaces intertubulaires, des cellules conjonctives à prolongements multiples et ramifiés. On voit parfois ces cellules remplies d'énormes amas microbiens qui les distendent (Fig. 8, pl. V), et, autour d'elles, pas de tubercule, aucun vestige de réaction cellulaire, parce que sans doute les bacilles, tant qu'ils n'ont pas rompu leur enveloppe et restent enkystés au sein du protoplasma, n'ont pas d'action sur les cellules du voisinage. Cet envahissement par les bacilles des cellules conjonctives s'explique sans difficulté si l'on regarde ces éléments comme d'anciennes cellules migratrices, ainsi que l'admettent Langhans[1] pour les cellules fusiformes du tissu sous-cutané, et M. Metchnikoff[2] pour les cellules conjonctives des amphibies. Cette explication se trouve encore fortifiée par ce que nous apprend l'examen des reins pendant les premières phases de l'infection.

Une grenouille (*R. temporaria*) est inoculée dans le sac dorsal

1. Beobachtangen uber Resorption der Extravasate und Pigmentbildung in denselben, *Virchow's Arch.*, Bd. 49, S. 66.
2. *Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation*, p. 125.

avec une émulsion de bacilles pisciaires dans l'eau physiologique. Au bout de 10 minutes, on l'anesthésie par l'éther et on l'autopsie. On fait des prises de lymphe, et on prépare les pièces (foie, rate, reins) pour les coupes et l'examen ultérieur. La lymphe sous-cutanée et la lymphe péritonéale présentent déjà des leucocytes contenant des bacilles. L'examen de la lymphe chez les grenouilles qu'on sacrifie après 2 heures et demie, 4 heures, 5 heures, 24 heures, permet de constater dans la lymphe péritonéale, aussi bien que dans la lymphe sous-cutanée, la présence de bacilles libres ou inclus dans les leucocytes[1]. Ces éléments ne contiennent que quelques bacilles ou ils en sont remplis, et le noyau occupe la périphérie du corps cellulaire. Mais, en somme, dans la lymphe sous-cutanée ou péritonéale, et en particulier dans celle qui baigne le foyer d'inoculation, le nombre des bacilles libres ou inclus n'est pas considérable, il faut les chercher dans les préparations. C'est qu'en effet les microbes inoculés ne sont pas immobilisés dans le sac lymphatique : ils sont charriés par la lymphe, lancés avec celle-ci par les cœurs lymphatiques dans le système veineux. Bien qu'on puisse les retrouver dans le sang, c'est dans le dédale des systèmes portes, où presque tous sont entraînés et deviennent la proie des cellules, qu'il est facile d'en constater la présence.

Chez la grenouille de l'expérience citée plus haut, qui a été anesthésiée, 10 minutes après l'inoculation, puis autopsiée, il y avait déjà des bacilles phagocytés dans le foie et les reins. Leur nombre augmente dans les heures qui suivent. On les trouve de plus en plus nombreux dans ces organes et dans la rate. Mais c'est surtout dans les reins que s'accumulent les leucocytes chargés de bacilles ou les amas bacillaires trop volumineux.

M. Mesnil a déjà fait la même remarque pour le charbon introduit par voie intra-vasculaire. Nous ignorons la cause de cette affluence des bacilles dans les reins; peut-être pourrait-on l'expliquer par cette disposition spéciale des puits lymphatiques décrits par Nussbaum, et qui permet à la lymphe péritonéale de se déverser dans les vaisseaux du rein. Ainsi les

1. Pour la description des leucocytes de la grenouille, consulter, outre les ouvrages spéciaux, le travail de Kanthack et Hardy dans *Proc. of the Roy. Soc. of London*, 52, 1892, 1er nov., et le mémoire de Mesnil dans *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1895, p. 301.

bacilles ou les leucocytes bacillifères auraient, dans le rein, une double voie d'arrivée, par la grande circulation et par le courant de lymphe péritonéale.

Parmi ces nombreux leucocytes chargés de bacilles qu'on observe dans le rein, un certain nombre pourraient s'immobiliser et se transformer, d'après l'hypothèse énoncée plus haut, en cellules conjonctives.

Le foie a des cellules spéciales de défense : ce sont des cellules à protoplasma semé de granulations ou de masses pigmentaires. Au point de vue topographique, elles sont comparables à des cellules endothéliales. Les auteurs les assimilent aux cellules de Kupffer du foie des mammifères. M. Mesnil a observé leur rôle important comme phagocytes. Environ 10 minutes après l'inoculation de bacilles dans le sac dorsal (expérience citée plus haut) les cellules avaient déjà englobé quelques bacilles. Cette activité phagocytaire continue à se manifester à mesure que les bacilles arrivent dans les capillaires hépatiques, et le foie de la grenouille tuée 24 heures après l'inoculation fournit des coupes où l'on peut observer de nombreuses cellules pigmentaires remplies de bacilles isolés ou en amas. Le nombre de ces cellules à pigment contenant des bacilles est dans les premiers jours de la maladie bien supérieur à celui des leucocytes à bacilles inclus.

Le phagocytisme des cellules pigmentaires n'entrave pas le développement du bacille pisciaire, qui paraît offrir à l'action des sucs digestifs cellulaires le même genre de résistance que le bacille aviaire ou le bacille de Koch. Même tué par la chaleur, à 100°, il persiste longtemps à l'intérieur des cellules pigmentaires du foie. Vivant, il continue à proliférer dans les phagocytes, il envahit les cellules voisines, et dans les foies tuberculeux, à une période avancée, surtout dans les formes à prolifération bacillaire abondante, il ne reste pas souvent de trace de cette phagocytose du début par les cellules pigmentaires, qui peuvent disparaître plus ou moins complètement. Mais il n'en est pas toujours ainsi, et l'on peut observer dans le foie de la grenouille diverses variétés de tubercules à cellules pigmentaires. L'étude de l'action qu'exerce la température sur l'évolution de la tuberculose chez la grenouille va nous éclairer sur la signification qu'il faut donner à ces lésions.

Influence de la température. — La végétation du bacille pisciaire est très active, d'après Dubard [1], entre 10° et 30°, avec un optimum entre 22° et 27°. Il est facile de faire varier la température de la grenouille, de la maintenir au degré de l'optimum de développement et d'observer l'effet exercé sur l'évolution de la maladie. Il n'est pas sûr d'avance que le bacille se comportera, dans l'organisme de la grenouille ainsi influencée par la température, comme dans les milieux artificiels. L'expérience montre que la tuberculose évolue plus rapidement chez les grenouilles mises à 22° que chez les grenouilles au-dessous de 20°.

Quatre grenouilles sont inoculées dans le sac dorsal avec le bacille pisciaire. Deux sont mises à 21°-24°, les deux autres sont laissées dans le laboratoire dont la température est alors de 15-18° pendant le jour, mais s'abaisse notablement pendant la nuit. Les quatre grenouilles meurent tuberculeuses : les deux qui étaient à 21-24°, au bout de 24 et 27 jours, les deux qui étaient à la température ordinaire, au bout de 39 et 51 jours.

A partir de 34°, la végétation du bacille pisciaire cesse ou devient très lente, ainsi que l'a observé Dubard. Chez la grenouille verte mise dans la chambre-étuve à 35° [2], il y a aussi un arrêt de développement de la maladie.

Quatre grenouilles sont inoculées avec le bacille pisciaire, dans le sac dorsal. N° 1 et n° 2 sont mises à 22°, n° 3 et n° 4 sont mises à 35°. Au bout de 34 jours, n° 4 est retirée de l'étuve à 35°, mise à 22° pendant 48 jours, puis reportée à la température du laboratoire. Elle est vivante au bout de 5 mois et tenue en observation. N° 1 et n° 2 sont mortes tuberculeuses au bout de 58 et 81 jours.

N° 3, qui était à 35°, a été sacrifiée au bout de 59 jours. Tandis que le sang de n° 1, morte le 58e jour, donnait, sur pomme de terre glycérinée, de nombreuses colonies, on n'obtenait pas de colonies avec le sang de n° 3. Colonies nombreuses également avec l'ensemencement d'une parcelle de foie de n° 1. Le foie de n° 3 ne donne que des colonies rares et à dévelop-

1. *Rev. de la tub.*, 1898, p. 13.

2. La température ne se maintenait à 35° que pendant la nuit; pendant le jour, l'étuve était fréquemment ouverte, et la température oscillait habituellement entre 30 et 35°. De même l'étuve à 22° avait en réalité une température variable entre 21 et 23°.

pement tardif. Les bacilles n'ont donc pas proliféré dans l'organisme de la grenouille à 35° pendant 59 jours comme dans celui de la grenouille à 22°, mais ils n'étaient pas tous morts. On ne peut, *a fortiori*, attribuer la longue survie de n° 4 à la mort des bacilles sous l'influence d'une température de 35° pendant 34 jours. Mais cette action a suffi pour que, même après le retour à la température optima, les bacilles n'aient pu se développer aussi rapidement que chez les témoins n° 1 et n° 2 qui étaient restés constamment à cette température. Et, sans doute, le phénomène est plus complexe et ne se limite pas à cette action physique, car, pendant cet arrêt de développement, le microbe n'était pas dans un milieu indifférent, mais dans un organisme mettant en œuvre des moyens de défense.

Concluons seulement de l'expérience précédente que l'action de la température de 35°, pendant 34 jours à partir de l'inoculation, cause un ralentissement très marqué dans l'évolution de la tuberculose.

Une action beaucoup moins prolongée de la température de 35° suffit à retarder la marche de la maladie, comme le montre l'expérience suivante. Trois grenouilles vertes sont inoculées, dans le sac dorsal, avec le bacille pisciaire. N° 1 et n° 2 sont mises dans le laboratoire, à la température ordinaire. N° 3 est mise à 35°. Au bout de 9 jours elle est très amaigrie. Elle est mise à 22° pendant 45 jours, puis à la température ordinaire.

N° 1 est sacrifiée au bout de 54 jours; elle est atteinte de tuberculose, le foie est rempli de granulations.

N° 2 meurt tuberculeuse le 59e jour.

N° 3 est encore vivante au bout de 115 jours. Mais elle est très amaigrie, visiblement malade et serait morte sans doute peu après. Elle est sacrifiée. Le foie est rempli de granulations tuberculeuses à bacilles disséminés.

On peut aussi faire agir la température de 35° sur la tuberculose en évolution. Les conditions sont alors différentes; le bacille s'est déjà cultivé dans l'organisme lorsque intervient l'action pour lui défavorable de la température.

Une grenouille, n° 4, est inoculée dans le sac dorsal, en même temps que les grenouilles n° 1, 2, 3 de l'expérience précédente et avec la même émulsion de bacilles. Elle est laissée à la température ordinaire pendant 54 jours, puis mise à 35°.

Alors la grenouille n° 1, sacrifiée le 54e jour, ainsi qu'on l'a vu, avait le foie rempli de granulations tuberculeuses, et n° 2 est morte le 59e jour. On peut en conclure que n° 1 était parvenue à une période très avancée de la tuberculose, au 54e jour de la maladie, lorsqu'elle fut mise à 35°. Elle a supporté néanmoins cette température pendant 21 jours. Elle est morte sans amaigrissement notable, mais tuberculeuse, au bout de 144 jours après l'inoculation.

Il est possible que par une action suffisamment prolongée de la température de 35°, ou par des séjours alternatifs de 35° et au-dessous de 20°, on obtienne la guérison de cette tuberculose de la grenouille, surtout si l'on commence ce traitement lorsque les lésions sont encore au début.

L'expérience précédente montre que, même appliquée à une période avancée, l'action de la température de 35°, pendant 21 jours, prolonge de beaucoup la durée de la maladie.

Nous avons étudié, dans le foie, les processus histologiques qui correspondent à cette modification de la maladie sous l'influence de la température de 35°.

Le foie des grenouilles tuberculisées, et sacrifiées ou mortes après un séjour de 1 ou 2 semaines à 35°, présente une lésion uniforme caractérisée par des amas de cellules pigmentaires englobant les bacilles. On trouve peu de bacilles libres en dehors de ces amas.

Une erreur serait possible si l'on se bornait à cette constatation. Nous avons observé, en effet, que chez les grenouilles vertes non inoculées, le séjour à 35° suffit pour provoquer, dans le foie, l'apparition de cellules pigmentaires en amas. On pourrait donc supposer qu'il n'y a aucune relation entre la présence des bacilles et les agglomérations de cellules à pigment. Mais il suffit d'examiner les foies de grenouilles à 35°, sacrifiées après 3 jours, après 8 jours et plus, pour observer les résultats de la phagocytose par les cellules à pigment, tels que nous les avons décrits plus haut, et les agglomérations croissantes de ces cellules autour des bacilles. Soit que les cellules à pigment naissent des cellules endothéliales, en contact avec les bacilles arrêtés dans les capillaires du foie, soit qu'elles se déplacent, grâce aux expansions si étendues de leur protoplasme, et qu'elles

se portent vers les embolies bacillaires pour les englober, au bout de 1 à 2 semaines, le foie contient des amas de cellules pigmentaires, et c'est dans ces amas qu'on trouve tous ou presque tous les bacilles encore bien colorables et distincts, où la densité du pigment ne forme pas un écran opaque.

On trouve aussi des cellules pigmentaires dans la rate, dans les reins, chez les grenouilles à 35°. Mais ces tuberculoses pigmentaires de la rate et des reins ne sont pas comparables à ce qui s'observe dans le foie. Dans la rate, les cellules pigmentaires sont relativement peu nombreuses, il n'y a pas de rapport évident entre la position qu'elles occupent et la présence des bacilles : leurs propriétés phagocytaires sont douteuses ou peu accusées. Dans les reins, les cellules participent, il est vrai, à la formation des tubercules, mais d'une manière exceptionnelle ; elles sont encore bien moins nombreuses que dans la rate.

Nous avons peu étudié les cellules pigmentaires du poumon, leurs propriétés phagocytaires à l'égard du bacille pisciaire inoculé dans le sac dorsal nous ont paru peu développées.

L'importance des cellules à pigment du foie, comme cellules de défense, est encore plus manifeste dans les cas où la grenouille soumise à la température de 35° est déjà tuberculeuse. Chez la grenouille n° 4 de notre dernière expérience, bien que le foie fût criblé de nodules de nécrose à bacilles disséminés ou formant des amas, les cellules à pigment persistaient nombreuses, et, sur les coupes, elles formaient des croissants, des couronnes s'appliquant au pourtour des îlots nécrosés, ou même pénétraient jusqu'au centre de la lésion. (Fig. 9.)

Chez la grenouille de notre deuxième expérience, qui n'était restée que 9 jours à 35°, il n'y avait plus trace de cellules pigmentaires dans le foie profondément altéré par d'innombrables tubercules.

Même avec la grenouille rousse, qu'il est difficile de maintenir à 35°, on peut, sans dépasser la température de 30-34°, mettre en évidence cette multiplication des cellules à pigment du foie, autour et jusque dans la profondeur des lésions tuberculeuses, sous l'influence de la température.

Six grenouilles (*R. temporaria*) sont inoculées dans le sac dorsal avec le bacille pisciaire et mises à 22°. Au bout de 17 jours, les trois premières sont mises à 30-34°, tandis que les

trois dernières sont laissées à 22°. Celles-ci meurent successivement de tuberculose, avec des lésions considérables et point de tubercules pigmentaires dans le foie. Des trois premières, l'une meurt au bout de 5 jours, après la mise à 30-34°, avec des colonies géantes du foie, sans tubercules pigmentaires : les deux autres sont sacrifiées 8 et 45 jours après la mise à 30-34°. Elles ont le foie rempli de tubercules à bacilles disséminés. La plupart de ces tubercules présentent de nombreuses cellules à pigment qui pénètrent jusqu'au centre des lésions.

Notons qu'à cette température de 30-34°, un ballon de bouillon glycériné, ensemencé avec le bacille pisciaire et placé dans l'étuve à côté des bocaux à grenouilles, a donné une belle culture, quoique moins abondante que dans le ballon témoin, ensemencé de même et placé à 22°.

Il semble donc que l'activité des cellules à pigment est subordonnée à cette condition que le développement du bacille dans le foie ne soit pas trop rapide.

Chez les grenouilles, aussi bien à la température ordinaire qu'à 35°, alors que les bacilles inoculés arrivent dans le foie, ce sont les cellules à pigment qui ont le rôle le plus actif. Plus tard, chez les grenouilles à la température ordinaire ou à 22°, lorsque le bacille prolifère, les cellules pigmentaires tendent à disparaître et ne prennent souvent aucune part à la réaction cellulaire, qui n'est plus représentée que par le tubercule à cellules dites épithélioïdes et embryonnaires, à moins que celui-ci ne fasse défaut et que le bacille n'accomplisse son œuvre de destruction sans aucune entrave. Mais, l'intervention des cellules pigmentaires n'est pas toujours d'aussi courte durée ; même dans les conditions favorables à la culture du bacille et malgré leur impuissance à enrayer son développement, ces cellules poursuivent parfois l'œuvre de défense initiale, elles s'appliquent en couches plus ou moins épaisses à la surface des nodules qu'elles pénètrent et, sur les coupes, elles apparaissent comme précédemment, sous la forme de croissants, de couronnes noirâtres ou brunâtres appliqués à la périphérie des îlots tuberculeux. (Fig. 9, pl. V.)

Nous avons observé cette réaction persistante des cellules pigmentaires même chez les grenouilles laissées à la température ordinaire ou à 22°, dans des cas où la durée de la maladie

avait été de 8 à 10 semaines, autour de lésions à bacilles disséminés ou à faibles amas : nous ne l'avons jamais rencontrée autour des colonies géantes.

Ainsi le bacille pisciaire se développe chez la grenouille sous des formes encore plus variées que le bacille de Koch, chez les mammifères. Si les réactions cellulaires varient selon les espèces, ce que l'on peut dire des espèces s'applique, dans une certaine mesure, aux organes : chaque organe se défend comme il peut. Nous voyons dans le foie de la grenouille des cellules spéciales qui se distinguent des cellules migratrices ordinaires. Ce sont les cellules pigmentaires Elles ne participent pas nécessairement à la formation des tubercules. Mais, dans certaines conditions, elles apparaissent plus nombreuses et viennent se joindre, comme cellules de renfort, aux agglomérations déjà constituées. Nous pouvons faire naître ces conditions en élevant la température. Alors, en même temps que la maladie est enrayée ou ralentit sa marche, le rôle de ces cellules devient prédominant.

EXPLICATION DES FIGURES DE LA PL. N.

Fig. 1. — Filaments composés de bacilles pisciaires, à la périphérie de colonies en goutte pendante. La goutte a été desséchée, fixée, colorée par le Ziehl. D'après une photographie. $Gr^t = 2,000/1$.

Fig. 2. — Tubercule du foie avec amas bacillaires, séparé des travées saines par un espace clair. Ziehl. Hématoxyline. $Gr^t = 300/1$.

Fig. 3. — Tubercule à zone centrale caséeuse. A la périphérie, amas de bacilles. Ziehl. Bleu de méthylène. $Gr^t = 300/1$.

Fig. 4. — Aspect du foie tuberculeux dans la forme à amas bacillaires et à un faible grossissement : Ziehl. Bleu de méthylène. $Gr^t = 70/1$.

Fig. 5. — Colonie géante du foie. Les travées sont très altérées. Ziehl. Hématoxyline. $Gr^t = 250/1$.

Fig. 6. — Filaments longs et grêles de bacilles pisciaires à la surface des cellules hépatiques qui ne paraissent pas altérées, chez le triton vulgaire. Ziehl. Hématoxyline. $Gr^t = 1,000/1$.

Fig. 7. — Tubercule du rein avec amas bacillaires. Deux coupes de tubuli, à la limite du tubercule.

Fig. 8. a, b. — Cellules conjonctives du rein remplies de bacilles. Picro-carmin-Gram. $Gr^t = 1,000/1$.

Fig. 9. — Couronnes et croissants formés de cellules à pigment autour de lésions tuberculeuses du foie. Ziehl. Hématoxyline.

CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE DE LA FIÈVRE TYPHOIDE ET DE SON BACILLE

(Procédé nouveau pour déceler le bacille d'Éberth dans les selles et les eaux.)

Par L. REMY

Dr en sciences et en médecine,
Chef des travaux à la section de bactériologie annexée au laboratoire d'analyses de l'État de Liége[1].

La fièvre typhoïde a fait l'objet d'un nombre considérable de travaux : Baumgarten[2] en signale déjà 380 de 1894 à 1898 inclus, et depuis lors ce nombre a considérablement augmenté encore.

Si nous jetons un coup d'œil d'ensemble sur la littérature de cette importante question, nous constatons qu'on peut y distinguer 3 périodes :

Dans la première, le bacille trouvé par Éberth en 1880 et étudié particulièrement par Gaffky en 1883, était considéré sans conteste comme l'agent spécifique de la fièvre typhoïde, et tous les bactériologistes étaient unanimes à lui reconnaître les caractères que lui avait assignés Gaffky.

Avec la découverte du *bacillus coli* par Escherich, s'ouvre la seconde phase. Le scepticisme s'introduisit bientôt dans les esprits relativement à la distinction du bacille d'Éberth et du *bacterium coli commune*. De là à la négation de la spécificité du bacille typhique, il n'y avait qu'un pas qui fut rapidement franchi. Dès 1889, Rodet et Roux[3] prétendirent que le bacille

1. Nos recherches ont été faites au Laboratoire de la clinique médicale, professeur M. Masius, et à notre Laboratoire.

Qu'il nous soit donc permis d'adresser à M. le professeur Masius l'hommage de nos sentiments de profonde reconnaissance pour la bienveillance avec laquelle l nous a ouvert les portes de son laboratoire.

C'est aussi pour nous un devoir d'exprimer à notre confrère et ami M. le Dr Beco (chef des travaux au Laboratoire de la Clinique médicale) nos vifs remerciements pour les nombreux services qu'il nous a rendus pendant l'élaboration de notre travail.

2. *Baumgarten's Jahresbericht.*

3. Sur les relations du B. coli communis avec le B. d'Eberth et avec la F. typhoïde, *Comptes rendus hebd. des séances et Mém. de la Société de Biologie*, t. II, 9e série, page 9.

d'Éberth « n'était qu'une variété du *bacillus coli communis*, créée dans l'organisme du typhique ». En 1892, Malvoz[1] soutint la même thèse : Rodet[2] continue d'ailleurs encore à la défendre à l'heure actuelle.

La gélatine d'Elsner et la découverte des propriétés agglutinantes du bacille d'Éberth par le sérum spécifique marquent le début de la 3e période. La spécificité du bacille typhique fut de nouveau reconnue. Toutefois l'accord n'est pas encore complètement établi à l'heure actuelle, et la théorie de l'origine colienne de la fièvre typhoïde possède encore des partisans. Ils basent leur opinion :

1° Sur la rareté du bacille d'Éberth dans les selles de malades atteints de dothiénentérie;

2° Sur l'antagonisme qui se produit entre le bacille d'Éberth et le B. coli lorsque ceux-ci vivent côte à côte dans un même milieu nutritif;

3° Sur l'absence presque constante du bacille typhique dans les eaux qui ont donné la fièvre typhoïde, alors que l'on y rencontre toujours le bacterium coli ou des organismes de transition entre ce dernier et le bacille d'Éberth.

C'est dans le but d'apporter notre contribution à l'éclaircissement de ces importantes questions que nous résumons aujourd'hui les expériences que nous avons entreprises afin de tâcher de les résoudre. Notre travail comprend trois parties :

1° Recherches bactériologiques sur les déjections dans la fièvre typhoïde. Procédé nouveau pour isoler le B. typhique des selles ;

2° Recherches sur l'antagonisme entre le B. typhique et le *bacterium coli commune ;*

3° Recherches du B. typhique dans les eaux. — Procédé pour déceler le B. typhique dans les eaux de boisson et de rivière.

PREMIÈRE PARTIE

RECHERCHES SUR LES DÉJECTIONS DANS LA FIÈVRE TYPHOIDE. — PROCÉDÉ NOUVEAU POUR ISOLER LE BACILLE TYPHIQUE DES SELLES

La présence du B. typhique dans les selles est d'une importance considérable tant au point de vue doctrinal qu'au

1. *Mémoires couronnés et autres*, Ac. roy. Méd. de Belgique, 1892.
2. *Journal de physiologie et pathologie générale*, 1899.

point de vue du diagnostic; aussi beaucoup de bactériologistes se sont-ils appliqués à l'y déceler. Peu cependant y sont parvenus. Gaffky[1], di Vestea[1], Pfühl[1], Eisenberg[1], Rodet et Roux[1], l'ont vainement cherché. Pfeiffer[1], Seitz[1], Merkel[1], Karlinski[1] et Chantemesse l'y ont quelquefois rencontré, mais, comme le fait remarquer Sanarelli, ils ont basé la détermination des organismes sur des caractères qui en 1894 déjà n'avaient plus guère de valeur; aussi l'auteur prétendait-il alors que jamais le B. d'Éberth n'avait été retiré des selles typhiques. Nous l'admettons d'autant plus volontiers que la gélatine ordinaire dont on se servait ne permet guère d'isoler le B. typhique en présence du *bacterium coli*. Dès 1892, nous avions constaté ce fait, et, dans un travail que nous avons publié alors en collaboration avec M. le Dr Sügg[2], sous la direction de M. le professeur Van Ermengem, nous exprimions le désir de connaître une gélatine permettant de distinguer sur plaques les colonies typhiques des colonies coliennes.

En 1894, Nicolle[3] rencontre les mêmes difficultés que nous. Il n'est donc pas surprenant que Wathelet[4], qui, en 1895, se contentait encore du procédé défectueux des plaques de gélatine ordinaire, n'ait trouvé que 10 colonies typhiques sur 600 colonies éberthiformes qu'il avait repiquées des selles de typhisés.

En 1895, Elsner[5], grâce à sa gélatine au suc de pommes de terre, retire le bacille tyhique des fèces 15 fois sur 17 cas. La recherche réussit au 7e jour et encore dans la 6e semaine. La même année, Brieg[6] le trouve 10 fois sur 11 cas. Les bacilles étaient nombreux à la période d'état, ils diminuaient au déclin de la fièvre.

En 1896, Chantemesse[7], avec la gélatine d'Elsner, signale 13 cas où l'examen renouvelé à plusieurs reprises lui a donné des résultats positifs.

1. Cités par Sanarelli, *Annales de l'Institut Pasteur*, tome VIII, 1894.
2. Recherches sur le B. d'Eberth-Gaffky. Caractères distinctifs du B. de la fièvre typhoïde, *Annales de la Société de Médecine*, Gand, 1892.
3. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1894.
4. Recherches bactériologiques sur les déject. dans la F. typh., *Ann. Inst Pasteur*, 1895.
5. *Centralbl. für Bakt. und Parasit.*, 1895.
6. *Deutsch Med. Wochensch.*, 1895, n° 5.
7. Diagn. précoce de la F. typh. par l'exam. bact. des garde-robes, *Archives de physiologie*, 1896.

La même année, Courmont[1] l'isole 2 fois chez 9 typhiques et jamais chez d'autres malades ; il en conclut :

1° « Que le milieu d'Elsner met facilement en évidence les différences de végétabilité du bacille d'Éberth et du bacille coli provenant de nos cultures. »

2° « Ces différences ne sont pas absolues et s'effacent facilement dans les cultures de selles typhiques, où le bacille coli prend souvent l'aspect éberthiforme. »

En 1896 également, Pollak[2], employant la même gélatine, isole le B. d'Éberth dans 20 cas.

Van de Velde[3], à son tour, en 1898, déclare n'avoir pu retrouver le B. de Gaffky que dans 3 cas sur 5, et encore ces organismes étaient-ils en nombre très restreint.

Si certains bactériologistes sont parvenus à retirer le B. d'Éberth des selles par le procédé d'Elsner, d'autres au contraire n'ont obtenu que des résultats inconstants ou négatifs. *A priori*, d'ailleurs, il semble qu'il devait en être ainsi. La gélatine d'Elsner est en effet fabriquée avec une décoction de pommes de terre; or la composition chimique de celles-ci est excessivement instable, elle diffère non seulement suivant la variété, mais encore avec la nature du terrain et des engrais, et, toutes autres conditions égales d'ailleurs, avec l'époque de la récolte et celle de l'utilisation.

Si la gélatine d'Elsner était très inconstante au point de vue de sa composition chimique, elle ne l'était pas moins par l'incertitude qui existait dans le mode de préparation préconisé par l'auteur. Grimbert,[4] en 1896, a fait à ce point de vue le procès de cette gélatine, qui devait être « faiblement, mais encore acide ». Il a proposé alors une acidité telle que 10 c. c. soient neutralisés par 4 à 5 c. c. d'eau de chaux; il a constaté que dans ces conditions il obtenait des résultats sensiblement identiques avec ou sans l'addition de KI, et de même quand il remplaçait la décoction de pommes de terre par une macération de viande (4 heures). Il lui a substitué une gélatine de composition chimique constante dont voici la formule :

1. Rech. du B. d'Eb, dans les selles, par le procédé d'Elsner. *Arch. de physiologie*, 1896.
2. *Deutsch. med. Wochensch.*, 1895, n° 5.
3. *Centralbl. für Bakt. und Parasit.*, B. XXIII, 1898.
4. Sur la préparation du milieu d'Elsner, *Archives de physiologie*, 1896, p. 722.

Eau distillée........................	1.000 grammes.
Maltose..............................	1 gramme.
Amidon soluble.......................	2 grammes.
Asparagine...........................	2 —
Phosphate neutre de K	2 —
Sulfate de K.........................	2 —
Sulfate de Mg........................	2 —
Bimalate d'ammoniaque,...............	2 —
Carbonate de Mg......................	1 gramme.

Le liquide contenant ces différents sels sert à fabriquer une gélatine d'une acidité telle que 10 c. c. soient neutralisés par 5 c. c. d'eau de chaux. Par l'emploi de sa gélatine, Grimbert, sur 6 cas de fièvre typhoïde, a obtenu 4 fois le bacille d'Eberth, et les 2 cas négatifs correspondaient à la période de convalescence. D'après l'auteur, les colonies n'apparaissent pas avant le 3e jour.

Pour notre part nous craignons bien que les propriétés nutritives de cette gélatine ne soient trop faibles pour permettre le développement du B. typhique quand celui-ci n'est pas doué d'une grande vitalité. Cette crainte nous paraît d'autant plus légitime que l'acidité est très forte, elle équivaut en effet à 1/1000 d'H^2SO^4 environ.

L'apparition tardive des colonies, ainsi que les résultats négatifs que l'auteur a obtenus à la période de convalescence, justifient pleinement notre manière de voir.

Les procédés dont nous disposons pour isoler le bacille d'Éberth des selles sont donc encore trop imparfaits pour qu'ils puissent être d'une application facile en clinique. Cependant, il faut bien reconnaître que la présence du B. d'Éberth dans les matières fécales d'une personne que l'on croit atteinte de dothiénentérie est, de tous les signes qui plaident en faveur de cette affection, le seul qui, pris isolément, entraîne la certitude. Chacun des symptômes qui constituent le syndrôme classique non seulement peut manquer, mais encore peut être rencontré dans des affections qui n'ont rien de commun avec la fièvre typhoïde. Le séro-diagnostic lui-même qui, dans certains cas, nous permet de juger rapidement la nature de la maladie, fournit assez souvent des résultats incertains dont la cause est indépendante de la volonté de l'observateur. Il a en effet été établi à suffisance de preuves par Achard et Bensaude[1], Van de Velde[2], Beco[3], que

1. Sur l'agglutinat des divers échantillons de B. typhiques et de bacilles paratyphiques. *Archives de physiologie*, 1896, page 940.
2. Études sur les résultats négatifs obtenus par la méthode de Widal dans le séro-diag. de la F. typh., *Bulletins acad. médecine de Belgique* 1897.
3. Sur la valeur séméiologique du séro-diagn. de la F. typhoïde. *Annales de la Société médico-chirurgicale de Liége*, 1897.

non seulement les divers échantillons de bacilles d'Éberth manifestent une aptitude variable à être agglutinés par un même sérum, mais en outre qu'une même variété de bacilles d'Eberth réagissait de façon inégale vis-à-vis de sérums différents. De plus, Achard et Bensaude, Jez[1], Beco, Du Mesnil de Rochemont ont signalé des cas d'agglutination dans des infections non typhiques, tandis que Biberstein[2], Busch[3], Schumacher[4], Hesse[5], Fischer[6] mentionnent des cas de fièvre typhoïde authentique dans lesquels la séro-réaction faisait défaut. Enfin, Ziencke[7], Stern[8], Van Ordt[9], Kühnau[10], Dineur[11], rapportent des cas d'agglutination positive par le sérum normal en l'absence d'infection typhique antérieure. Toutefois, il faut bien reconnaître que le sérum provenant d'individus sains ou atteints d'affections autres que la fièvre typhoïde agglutine le B. typhique à des dilutions plus faibles que le sérum fourni par des typhoïdiques. Il en résulte que, pour oser affirmer l'existence de fièvre typhoïde en se basant sur le séro-diagnostic, il faut que celui-ci soit positif à la dilution de 1/50 au moins. Or il est malheureusement des cas nombreux de dothiénentérie où le pouvoir agglutinant n'atteint ce titre élevé que dans une période déjà avancée de la maladie, ou même ne l'atteint jamais.

Sur 14 cas énumérés par Beco[12], 6 fois le sérum n'agglutinait que de 1/10 à 1/20 du 12e au 20e jour. Hila[13] cite également plusieurs cas analogues.

Le séro-diagnostic n'est donc pas rigoureusement spécifique, puisqu'il peut s'observer dans des affections autres que la fièvre

1. *Wiener Med. Wochensch.*, 1897, n° 3, cité par Biberstein, *Zeitsch. für Hyg.*, tome XXVII, p. 347.
2. *Zeitschr. f. Hygiene*, tome XXVII, p. 347,
3. Ueber das Vorkommen von Typhus im Knochenmark, *Zeit. f. Hyg.*, B. XXVIII, 478.
4. Bemerkung zù einem Fall von Typhus abdom. mit fehlender Widal'scher Reaction, *Zeit. f. Hyg.*, B. XXX, 1899.
5. Die Typhusepidémie in Löbtau im Jahre 1899, *Zeits. f. Hyg.*, B. XXXII, 1899.
6. Welchen praktisch. Werth hat die Widal'sche React., *Zeits. f. Hyg.*, B. XXXIII, 1899.
7. *Deutsche Med. Woch.* 1897, cité par Biberstein, *Zeitsch. f. Hyg.*, B. XXVII.
8. *Berliner Klinik Wochern* cité par Biberstein, *Zeitsch. f. Hyg.*, B. XXVII.
9. *Munch. med. Woch.* cité par Biberstein, *Zeitsch. f. Hyg.*, B. XXVII.
10 et 11. Cité par Biberstein, *Zeitsch. f. Hyg.*, B. XXVII.
12. *Loco citato*, p. 9.
13. *Annales de la Société médico-chirurgicale de Liège*, 1899.

typhoïde et même en dehors de toute affection, et qu'il peut faire défaut dans des cas de typhoïde authentique, ou exister à un titre tellement faible qu'il ne permet pas de conclure avec certitude à l'existence de la dothiénentérie.

La présence du B. typhique dans les selles reste donc le seul signe qui, pris isolément, suffit à assurer le diagnostic de fièvre typhoïde : c'est aussi le seul qui ne puisse pas manquer. En conséquence la recherche de cet organisme dans les déjections acquiert une importance considérable, et il est nécessaire de se familiariser avec elle. Or, si les bactériologistes allemands louent la gélatine d'Elsner employée dans ce but, les microbiologistes français ne partagent pas unanimement cet enthousiasme, et les résultats qu'on en a obtenus en Belgique sont très contingents. Cela tient, comme nous l'avons signalé plus haut, à la trop grande variabilité de la composition chimique de la pomme de terre. Pour obvier à cet inconvénient, nous avons, après des expériences minutieuses et très longues, adopté une gélatine différentielle avec laquelle nous avons entrepris les recherches qui feront l'objet de ce mémoire.

La composition chimique de cette gélatine correspond sensiblement à celle de la pomme de terre, que M. Petermann a bien voulu nous transmettre. Seulement la dextrine et la glycose ont été supprimées, et le phosphate bisodique a été substitué au phosphate bipotassique. En voici la composition :

Eau distillée	1.000 grammes.
Asparagine	6 —
Acide oxalique	0gr,5.
Acide lactique	0gr,15.
Acide citrique	0gr,15.
Phosphate bisodique	5 grammes.
Sulfate Mg	2gr,50.
Sulfate K	1gr,25.
Chlorure Na	2 grammes.

Ces différents sels, le sulfate de Mg. excepté, sont broyés dans un mortier, puis introduits dans un matras avec un litre d'eau distillée et 30 grammes de peptone Witte ou Grübler. On chauffe ensuite à l'autoclave sous pression pendant 1/4 d'heure. Dès qu'on retire le matras, on en verse le contenu bouillant dans un autre matras, lequel a préalablement reçu 120-150 gram-

mes de gélatine [1], on agite pour dissoudre celle-ci, puis on ajoute de la soude jusqu'à alcalinisation légère. On cuit à l'autoclave à 110° sous pression pendant 1/4 d'heure, puis on acidifie avec une solution demi-normale de H^2SO^4, de telle sorte que 10 c. c. de gélatine aient une acidité telle que celle-ci disparaît par l'addition de 0, 2 c. c. de solution demi normale de soude. Cette acidité équivaut à 0,5 de H^2SO^4 par litre. Après agitation, on remet au poêle à vapeur pendant 8-10 minutes, puis on filtre. Quand la filtration est obtenue, on vérifie l'acidité. Pour cela, on prélève à l'aide d'une pipette graduée 10 c. c. de gélatine que l'on dépose dans un vase de Bohême contenant environ 100 c. c. d'eau distillée exactement neutre et 4 à 5 gouttes de phtaléine du phénol. On laisse alors tomber goutte à goutte au moyen d'une pipette de 1 c. c., graduée en centièmes, la solution demi normale de soude. La coloration rouge doit apparaître sitôt que 0, 2 c. c. de la solution sodique ont été ajoutés aux 10 c. c. de gélatine. Dès que l'acidité voulue est obtenue, on introduit le $MgSO^4$ à la dose de 2,50 par litre de gélatine, on répartit en tubes, 10 c. c. dans chacun, et on stérilise en 3 séances comme pour la gélatine ordinaire.

Au moment de l'emploi, on introduit dans chaque tube de gélatine 1 c. c. d'une solution de lactose à 35 pour cent, et 0, 1 c. c. d'une solution phéniquée à 2, 5 p. cent. Lorsque Elsner fit connaître sa gélatine au suc de pommes de terre, nous étions en possession de celle dont nous venons de donner la composition, seulement nous ne l'avions étudiée qu'avec quelques-uns des bacilles typhiques et *coli* de notre laboratoire. Elle a d'ailleurs été publiée en 1896 [1], après que nous eûmes vérifié la façon dont se comportaient les divers bacilles que nous pûmes nous procurer.

1. La gélatine qui nous a donné les meilleurs résultats avait, pour marque : « République française, gélatine supérieure. » La plupart des autres marques convenaient moins bien.

2. *Résumé des rapports des directeurs des laboratoires d'analyses de l'État pour l'exercice* 1896, page 44.

COMMENT SE COMPORTENT LES BACILLES COLI ET TYPHIQUE DES LABORATOIRES DANS LA GÉLATINE DIFFÉRENTIELLE?

A. Bacille coli. — Les colonies apparaissent après deux jours, les unes sont profondes, les autres sont superficielles.

I. Colonies profondes. — Elles sont arrondies, ovoïdes, parfois fusiformes et d'une coloration brun-jaunâtre.

De fines bulles de gaz provenant de la décomposition de la lactose les accompagnent parfois.

Colonies superficielles. — On en distingue deux espèces : les unes non étalées, globuleuses, d'une coloration brun jaunâtre, munies parfois de prolongements verticaux qui s'élèvent au-dessus de la surface de la gélatine ; les autres, étalées à contour irrégulier, sont opaques. Au début elles sont parfois transparentes et bleutées, mais elles gagnent rapidement leur opacité.

B. Bacille d'Eberth. — Les colonies typhiques se montrent également après 2 jours et sont profondes ou superficielles.

I. *Colonies profondes.* — D'une coloration blanc bleutée, plus petites que les colonies coliennes, mais cependant très distinctes à l'œil nu, les colonies éberthiennes profondes ne donnent jamais de bulles de gaz.

II. *Colonies étalées.* — Elles ne sont généralement bien visibles qu'au 3e jour. Au début elles rappellent assez bien l'aspect des moisissures, plus tard elles s'étalent, deviennent plus bleutées et peuvent alors parfois atteindre les dimensions d'une pièce de 50 centimes.

Quand le bacille typhique est doué d'une grande vitalité, lorsqu'il provient de la rate par exemple, ses colonies superficielles se rapprochent davantage de celles du *coli*. Les colonies profondes conservent leur aspect typhique.

Quand le *bacillus coli* est affaibli, ses colonies profondes sont moins distinctes, elles peuvent perdre alors leur teinte brunâtre et devenir bleutées ; dans ce cas elles sont plus bleues que les colonies typhiques.

Les colonies profondes se reconnaissent le mieux en les examinant par transparence derrière un écran noir arrivant sensiblement à la hauteur des yeux. Avec un peu de tâtonnement, on finit par trouver aisément une position dans laquelle les colonies se distinguent parfaitement, on les marque alors au crayon bleu pour le repiquage.

COMMENT SE COMPORTENT LES BACILLES COLI ET TYPHIQUE DES SELLES DANS CETTE GÉLATINE?

A. Bacille coli. — Les colonies coliennes gardent sensiblement les caractères qui ont été décrits pour les organismes de laboratoires.

B. Bacille d'Eberth. — Les colonies éberthiennes se comportent de même : certaines colonies superficielles cependant ont parfois un aspect particulier qui les fait ressembler à de fines gouttes d'eau.

Il importe de remarquer que les colonies, tant coliennes que typhiques, quand on en refait des plaques de gélatine, reproduisent des colonies d'autres variétés et inversement.

Les staphylocoques, les streptocoques et tous les organismes en général poussent dans cette gélatine avec les caractères qui leur sont particuliers.

Cette gélatine n'est donc pas élective, et les tentatives diverses que nous avons faites dans le cours de nos recherches bactériologiques sur les selles, pour éliminer les streptocoques et les staphylocoques, ont malheureusement échoué.

Nous avons ainsi employé sans résultats :

1° L'acide phénique à doses variables;

2° L'acide benzoïque seul ou combiné à l'acide phénique;

3° L'acide formique seul ou aidé de l'un des acides phénique ou benzoïque.

Toutefois les microbes liquéfiants y poussent mal, surtout si l'on porte la dose d'acide phénique à 0,5 p. 1,000.

Cette gélatine nous a permis de rechercher le B. typhique dans les selles de typhisés d'abord, puis dans les selles de personnes atteintes d'affections autres que la fièvre typhoïde.

1. Recherche du bacille d'Eberth dans les selles typhiques.

Procédé opératoire. — 1re dilution, 0,2 c. c. de matières fécales sont introduits dans 10 c. c. d'eau stérilisée.

2e *dilution.* — 1 anse[1] de la première dilution a été ajoutée à 10 c. c. d'eau stérilisée.

1. Nous nous sommes servi d'une anse double, toujours la même, afin de prélever chaque fois des quantités sensiblement égales et d'obtenir ainsi des résultats comparables autant que possible.

1, 2, 3 anses ont servi à faire 3 plaques[1] de gélatine (comme nous l'avons indiqué page 561). Ces plaques ont été autant que possible placées à la température de 20°-22°. Dès que les colonies étaient apparues, c'est-à-dire après 2-3 jours suivant les cas, nous marquions au crayon bleu les colonies que nous désirions repiquer pour en faire l'étude ultérieure; puis, à l'aide d'une anse simple de platine stérilisée, nous séparions par 4 traits rectangulaires la colonie du restant de la gélatine. Le petit cube ainsi isolé était enlevé avec l'anse de platine, puis placé dans un tube de bouillon que nous portions ensuite à l'étuve à 37°. Le lendemain nous examinions la mobilité, nous ensemencions 1 ou 2 anses de cette culture dans un tube de gélatine (différentielle ou non) lactosée, liquéfiée au préalable. Après agitation ce tube était plongé dans l'eau froide pour obtenir la solidification rapide, puis porté à la température de 20°-22°. Dans ces conditions le bacille coli donne des bulles abondantes après 24 heures.

La même culture en bouillon servait également à faire la réaction agglutinante à l'aide d'un sérum antityphique expérimental agglutinant à un titre très élevé le bacille Gaffky de nos cultures.

Nous ne considérions comme typhiques que les bacilles mobiles qui ne donnaient pas la réaction de l'indol, qui ne faisaient pas fermenter la lactose, et qui étaient agglutinés à une dilution très forte, 1/80000 par le sérum expérimental.

Nous avons aussi souvent pratiqué l'agglutination par la formaline préconisée par Malvoz[2] pour la différenciation des B. typhiques et des B. coli.

Ces caractères nous semblent suffisants à l'heure actuelle pour identifier le B. typhique. Les recherches de Wernicke[3], et Busenius, Van de Velde[4], Busch[5], Rodet[6], Beco[7], l'ont d'ailleurs surabondamment démontré déjà.

1. Nous avons employé de préférence les plaques de Koch. Les cristallisoirs de Pétri ne présentant pas toujours un fond bien horizontal, la gélatine se tasse à la périphérie et le repiquage est alors difficile.

2. Agglut. par les subst. chimiques. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1897, page 583.

3. Ein Beitrag z. Kenntnis des typhus epid. *Zeitsch. f. Hyg.* 1895, p. 611.

4. Valeur de l'agg. dans la diagnose de Widal et dans l'identifi. des bacilles éberthif. *Centralbl. f. Bakter.* B. T. XXIII, 1898.

5. Ueber das Vorkommen von typhus im Knochenmark. *Zeitsch. für Hyg.* B. XXVIII, p. 478.

6. Des races de B. coli au point de vue de leur aptitude à être aggl. par le sérum des animaux immunisés, *Archives de biologie*, 11e série, t. I. (1899), p. 349.

7. Note sur la valeur de l'aggl. par le sérum antityph. expérim. comme moyen de diag. entre le B. d'Eberth et les races coliformes, *Centralbl. f. Bakt.* B. XXVI, p. 136, 1899.

RÉSUMÉ DES CAS DE FIÈVRE TYPHOIDE DANS LESQUELS L'ANALYSE BACTÉRIOLOGIQUE DES SELLES A ÉTÉ PRATIQUÉE.

Avant de résumer ces observations, nous croyons utile de donner quelques renseignements préliminaires, afin de mieux préciser les conditions dans lesquelles nous avons opéré :

1° La longueur des prodromes étant très variable et les signes cliniques de cette période n'étant que ceux du 1er septénaire atténués, il est difficile de délimiter exactement le début de celui-ci. Pour avoir un terme de comparaison plus facile à déterminer, nous avons compté les jours de la maladie à partir du moment où le malade s'est alité;

2° Nous nous sommes efforcé non seulement de déceler le B. typhique dans les selles, mais surtout de compter les colonies de B. d'Eberth et de B. coli. En raison des difficultés inhérentes à cette numération, il est évident que les chiffres ne sont qu'approximatifs. Pour qu'ils fussent d'une rigueur mathématique, il eût fallu repiquer et étudier chaque fois toutes les colonies développées sur plaques. C'eût été là nous imposer un travail et une perte de temps considérables, que n'aurait pas compensé le profit que nous pouvions en retirer. A part quelques exceptions, nous nous sommes donc contenté de repiquer et de caractériser une dizaine des colonies de chacune des diverses variétés représentées sur plaques, et nous en avons conclu à l'identité des organismes constituant les autres colonies de la même variété;

3° L'agglutination par le sérum des malades dont nous avons étudié les selles a été faite au point de vue essentiellement clinique. Le titre de 1/50 que nous donnons fréquemment ne représente donc pas un maxinum, mais bien la dilution nécessaire pour autoriser le diagnostic de fièvre typhoïde.

Numéros d'ordre.	Date de l'examen des selles.	Nombre de jours écoulés entre alitement et examen des selles.	Nombre [illegible]	Nombre total de colonies.	Nombre de colonies typhiques.	Nombre de colonies typh. étalées.	Nombre de colonies coliennes.	Résultat du séro-diagnostic.	OBSERVATIONS
1	7 1 99	10	2	50	30	0	20	1/50	
2	18 1 99	9	2	40	30	0	10	1/50	
3[1]	23 1 99	14	2	62	60	0	2	1/50	
4[2]	8 2 99	9	2	30	11	1	19	1/50	
5[3]	9 2 99	16	2	200	30	4	170	1/30	
6[4]	21 2 99	16	3	50	22	0	28	1/30	
7	4 3 99	39	4	105	5	0	100	1/30	7 = 2e examen de 6 au 30e jour de la maladie.
8	2 3 99	17	2	Repiquage impossible trop de colonies sur plaques.					
8′	27 3 99	42	3	380	40	0	300	1/50	8′ = 2e examen de 8.
9[2]	7 3 99	4	2	20	2	0	18	1/50	
10[3]	20 3 99	22	2	80	50	3	30	1/50	
11	5 4 99	9	2	50	20	0	30	1/30	
12	5 4 99	5	2	30	2	0	25	Nul.	
13	20 4 99	11	Les dilutions habituelles n'ont pas donné de colonies sur plaques.						
13′	25 4 99	16	5	10	2	1	4	1/10	13′ = 2e ensemencement de 13 dilutions fortes.
14	31 5 99	6	2	80	8	0	72	1/40	
15	31 5 99	5	2	100	5	0	95	1/50	
16	13 6 99	9	2	6	6	3	0	1/50	
17	20 6 99	16	3	100	20	0	80	1/50	
18	13 6 99	42	5	173	1	0	172	1/30	
19	19 6 99	53	4	200	0	0	200	1/30	19 = 18 au 58e jour de la maladie.
20	20 6 99	13	2	200	100	0	100	1/50	
21	23 6 99	5	3	100	4	0	96	Nul.	
22	28 6 99	10	2	100	5	0	95	Nul.	22 = 21 au 10e jour de la maladie.
23	21 9 99	45	4	55	10	0	45	1/50	
24	5 10 99	5	2	30	2	0	28	1/50	
25	10 10 99	10	2	40	26	0	14	1/50	25 = 24 au 10e jour de la maladie.
26	21 10 99	21	4	250	2	0	240	1/50	26 = 24 au 21e jour de la maladie.
27	23 10 99	45	4	40	12	0	28	1/50	
28	26 10 99	3	2	6	5	0	1	1/40	
29	27 10 99	11	2	150	100	0	50	1/30	
					590	9[5]			

1. Remarquons le nombre considérable de b. t dans l'intestin. Le malade meurt le soir de l'examen.

2. Certaines colonies côliennes, plus blanches que les colonies habituelles, donnaient la réaction de l'indol, mais ne faisaient pas fermenter la lactose.

3. Les plaques faites comparativement avec la gélatine ordinaire, ne nous ont pas permis de retirer le b. t. des selles.

4. Bien qu'au 3e septénaire, le nombre de b. typhiques est considérable dans l'intestin, alors que d'habitude, à un stade aussi avancé de la maladie, la quantité de b. d'Eberth est réduite. Le malade meurt précisément le lendemain de l'examen bactériologique des selles.

5. Parmi les 590 colonies de b. typhiques que nous avons observées, 9 seulement étaient étalées superficiellement. Ainsi s'expliquent les insuccès des bactériologistes qui, dans des recherches antérieures aux nôtres, se sont contentés de repiquer les colonies éberthiformes superficiel les étalées.

B. RECHERCHE DU BACILLE D'EBERTH DANS LES SELLES DE MALADES ATTEINTS D'AFFECTIONS NON TYPHIQUES

Nos recherches ont porté sur les déjections de 12 personnes atteintes de l'une des affections suivantes : grippe, néphrite, lithiase biliaire, tuberculose, hystérie, catarrhe gastrique, catarrhe gastro-intestinal, pneumonie, entérite.

Chez aucun de ces malades, nous n'avons trouvé dans les selles des bacilles présentant tous les caractères du bacille de Gaffky, alors même que nous avons parfois repiqué et étudié 50 colonies.

Dans un cas de grippe, nous avons constaté, pour 60 colonies de B. coli, une dizaine de colonies rappelant par leur aspect les colonies typhiques; mais elles n'ont pas troublé le bouillon dans lequel elles ont été repiquées.

Dans un cas de catarrhe gastro-intestinal et dans un cas d'entérite, nous avons également observé des colonies éberthiformes. Les organismes qui les constituaient étaient mobiles, ils ne donnaient pas la réaction de l'indol, ils ne faisaient pas fermenter la lactose, mais ils n'étaient pas agglutinés par le sérum antityphique expérimental. Or, à ce moment de nos recherches, de même que Wernicke et Busenius [1], Van de Velde [2], Busch [3], Rodet [4], Beco [5], nous attachions à la propriété d'être agglutiné à un titre élevé par le sérum expérimental une importance prépondérante pour la différenciation des espèces coliennes et éberthiennes. Nous avons donc éliminé ces bacilles et nous les avons considérés comme des *coli*.

CONCLUSIONS

Parvenu au terme de la première partie de nos recherches, nous nous croyons autorisé à en dégager les conclusions suivantes :

1° La gélatine différentielle dont nous avons donné la composition chimique constitue un milieu de culture pratique et sûr pour l'isolement du bacille typhique en présence du B. coli par la méthode des plaques;

2° Avec cette gélatine, nous avons effectué 34 recherches de B. typhiques dans les selles de 23 typhoïdiques aux différents

1. 2. 3. 4. 5. *Loc. cit.*

jours de la maladie. Trois fois le résultat a été négatif : 1 fois au 17e jour de la maladie (observ. 8) il y avait trop de colonies sur plaques; une deuxième fois, au 11e jour (observ. 13), il n'y avait pas de colonies sur plaques; le 3e résultat négatif provient d'un ensemencement pratiqué entre la 7e et la 8e semaine (observ. 19). Pour les 2 premières recherches négatives, l'examen ultérieur a été positif (observ. 8; et 13;); pour le 3e résultat infructueux, un ensemencement antérieur (observation 18) nous avait permis de retirer le B. typhique des déjections du même malade.

En résumé nous avons retiré le B. typhique des selles dans les 23 cas de dothiénentérie que nous avons étudiés, et cela aux jours suivants de la maladie :

1 fois au	3e jour.	Selle	28 du tableau ci-joint.	
1 —	4e —	—	9	— —
4 —	5e —	—	12, 15, 21, 24.	
1 —	6e —	—	14 du tableau ci-joint.	
4 —	9e —	—	2, 4, 11, 16.	
3 —	10e —	—	1, 22, 25.	
1 —	13e —	-	20.	
1 —	14e —	—	3.	
3 —	16e —	—	5, 6, 17.	
1 —	21e —	—	26.	
1 —	22e —	--	10.	
1 —	30e —	—	7.	
2 —	42e —	—	8, 18.	
2 —	45e —	—	23, 28.	

3° Restreint au début (observ. 24), le nombre des bacilles d'Eberth augmente considérablement au second septenaire (observ. 25), et parfois même alors il peut constituer presque à lui seul la flore intestinale (observ. 3, 16); il diminue ensuite progressivement (observ. 26) au 3e et au 4e septenaire, et il finit par disparaître insensiblement de l'intestin, ou du moins nous ne parvenons plus à l'en retirer par le procédé qui jusqu'alors nous avait réussi;

4° La flore microbienne intestinale est parfois représentée par un grand nombre d'espèces et de variétés (observ. 5. 8, 8 20, 22), tantôt au contraire par quelques espèces ou variétés de la même espèce (observ. 13', 16, 18);

5° Les bacilles typhiques retirés des selles de typhisés se ramènent à un seul et même type; ils ne donnent pas d'indol, ils ne font pas fermenter la lactose, ils sont tous agglutinés à un titre élevé par le sérum expérimental.

6° La formaline préconisée par le docteur Malvoz [1] pour la différenciation des espèces colienne et typhiques donne des résultats inconstants. En conséquence, nous croyons que l'on doit y renoncer dans la pratique. Ce résultat confirme ceux qu'ont obtenu déjà Widal et Nobécourt [2] et Beco [3];

7° Les bacilles typhiques extraits des selles au cours du second septenaire, de même que ceux que l'on retire de la rate à l'autopsie, possèdent une énergie vitale remarquable; ils donnent de belles colonies sur plaques après 48 heures, et celles-ci, repiquées, troublent abondamment le bouillon, parfois même les liquides minéraux;

8° Les bacilles que l'on trouve dans les selles à la fin de la maladie possèdent au contraire une vitalité faible. Les colonies apparaissent plus tardivement sur plaques (obs. 7, 18, 19) de gélatine, et, dans une série de colonies toutes semblables que l'on repique en bouillon, les unes peuplent abondamment ce dernier, les autres au contraire y poussent misérablement ou pas du tout;

9° Dans 3 cas (obs. 12, 21, 22), le bacille typhique a été trouvé dans les selles alors que les signes de la fièvre typhoïde, y compris la séro-réaction, faisaient défaut au moment de l'examen bactériologique. En conséquence, la présence du B. typhique avec les attributs que nous lui connaissons est, de tous les signes, le seul qui, pris isolément, puisse autoriser le clinicien à poser avec certitude le diagnostic de fièvre typhoïde;

10° Dans les selles de personnes atteintes d'affections autres que la dothiénentérie, nous n'avons pas trouvé de B. typhique authentique; nous avons isolé parfois (2 cas sur 12) un bacille présentant les caractères du B. d'Eberth, mais qui n'était pas sensible à l'action agglutinante du sérum antityphique;

11° La présence constante du B. typhique dans les selles de personnes atteintes de fièvre typhoïde, son absence dans l'intestin des malades atteints d'autres affections permettent d'affirmer que le B. typhique est bien l'agent de la fièvre typhoïde.

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1897, p. 582.
2. *Semaine médicale*, 4 août 1897.
3. *Centralbl. f. Bakt.* B. XXVI, année 1899, p. 136.

REVUES ET ANALYSES

Les Diastases Inorganiques.

REVUE CRITIQUE

Comparer les actions catalytiques à l'action des diastases n'est pas chose nouvelle. Dans une action catalytique, le corps qui intervient est en masse extrêmement petite par rapport à celle du corps qu'il transforme, et il se retrouve inaltéré à la fin de la réaction. On attribue également aux diastases ces deux propriétés.

L'analogie va plus loin, car certains métaux, tels que le platine, l'or, l'iridium, le palladium, l'argent à l'état très divisé sont capables de produire des actions catalytiques intenses (consistant en oxydations. dédoublements de produits organiques), précisément semblables à celles que produisent diverses diastases (acétification de l'alcool, inversion du saccharose, etc.). Inversement la décomposition de l'eau oxygénée en eau et en oxygène est produite non seulement par ces mêmes métaux, mais encore par une foule de diastases, l'amylase, l'émulsine, la myrosine, la pepsine. En élevant la température, on peut faire perdre aux diastases non seulement leur action spécifique, mais aussi leur action sur l'eau oxygénée[1]. Sous la même influence, les métaux divisés deviennent également inactifs. Ces analogies se multiplient quand on étudie l'action des métaux et des diastases dans des conditions variées. Aussi MM. Bredig et Muller von Berneck peuvent-ils dire, dans un travail récent et très curieux [2], que l'action des métaux divisés sur l'eau oxygénée offre un tableau-type des actions diastasiques.

Cependant cette action se rapproche sous certaines condititions des réactions ordinaires de la chimie dont elle suit les lois. Mais elle se laisse écarter de ces lois par une foule de circonstances, les mêmes qui modifient parfois si prodigieusement l'action des diastases organiques; — et comme on peut ici mieux saisir le mécanisme de ces modifications, l'étude de la décomposition de l'eau oxygénée par les métaux très divisés jette une certaine lumière sur l'origine des variations que subit l'action des diastases sous des influences variées.

1. L'action sur l'eau oxygénée ne diminue pas proportionnellement à l'action spécifique. Elle se perd à une température généralement moins élevée. Elle est peut-être due à une diastase spéciale mêlée à celle dont on étudie d'ordinaire les effets, mais surtout organique comme elle.

2. Action catalytique du platine sur l'eau oxygénée (*Zeitschr. f. phys. chimie*, XXXI, 1899.)

C'est surtout du platine que les auteurs se sont servis dans leurs expériences : au lieu d'employer ce métal sous les formes ordinaires de mousse ou de noir de platine, ils ont trouvé avantageux de recourir à des solutions colloïdales obtenues par l'un d'eux en faisant éclater sous l'eau un arc électrique entre deux gros fils de platine. L'eau (qu'on doit refroidir avec de la glace) se colore en brun foncé. Elle reste colorée après filtration et ne montre au microscope aucune hétérogénéité.

De telles solutions, contenant au maximum un atome-gramme de métal pour 1,300 litres, exercent avec une grande activité toutes les actions connues de la mousse de platine (coloration en bleu de la teinture gaïac mêlée d'eau oxygénée, décoloration de l'indigo par l'eau oxygénée, décomposition des hypochlorites en chlorures et oxygène, recombinaison à la température ordinaire du mélange d'oxygène et d'hydrogène à raison, dans une expérience, de 1 c. c. 8 par minute pour 2 c. c. 5 de solution contenant 0 mg, 17 de platine; cette vitesse de réaction s'est maintenue constante pendant 17 jours).

Ces solutions, pures ou diluées dans l'eau, exercent sur l'eau oxygénée une action dont les lois sont simples lorsqu'on ne met en présence que les corps réagissants et l'eau. Une quantité très petite d'un électrolyte pouvant modifier beaucoup cette action, il importe que l'eau qui sert tant à la préparation qu'à la dilution du platine soit particulièrement pure[1]. L'eau oxygénée (diluée d'eau) doit être de même purifiée très soigneusement, partie chimiquement, partie par distillation dans le vide.

En opérant avec ces corps ainsi purs, la réaction du milieu étant neutre ou très faiblement acide, et la dilution du platine ayant été préparée depuis quelque temps, de manière que le métal colloïdal ait pu s'y répandre d'une manière homogène, la vitesse de la réaction peut être représentée par la formule $\frac{dx}{dt} = K(a-x)$, a étant la concentration de H^2O^2 au début de l'expérience, x la quantité de ce corps qui a été détruite au temps t (par unité de volume), et K une constante qui dépend de la solution de platine et de la température. Une semblable formule exprime la vitesse des réactions dites *monomoléculaires*, dans lesquelles une seule molécule entre en jeu. Il est donc correct d'écrire en pareil cas, selon les lois de la cinétique chimique, $H^2O^2 = H^2O + O$, et non la formule doublée $2H^2O^2 = 2H^2O + O^2$. Seulement on doit admettre qu'à la suite de cette première réaction et, avec une vitesse beaucoup

1. Le meilleur contrôle de la pureté de cette eau est la mesure de la conductibilité électrique : cette quantité, fort petite quand l'eau est pure, augmente considérablement par l'addition d'une trace d'électrolyte. On peut se procurer le plus facilement une telle eau par des cristallisations partielles répétées d'eau distillée, en rejetant chaque fois la partie liquide.

plus grande, s'en produit une deuxième $2O = O^2$. Quoi qu'il en soit, voici notre action catalytique nettement classée par son allure entre les réactions chimiques ordinaires.

Si une telle vitesse de réaction rapproche l'action catalytique du platine des autres actions chimiques, elle paraît l'écarter de celles des diastases. Dans les cas malheureusement trop peu nombreux où la vitesse des transformations produites par les diastases s'est prêtée à une étude précise, M. Duclaux a montré que la vitesse au début de la réaction est indépendante de la quantité de matière à transformer et ne dépend seulement que de la quantité de diastase en solution dans le liquide. Les auteurs du mémoire ne se sont pas arrêtés à cette difficulté : ils ont donc vraisemblablement pensé qu'elle n'était pas insurmontable. Lorsqu'un corps A en petite quantité agit sur un corps B pour le transformer, et que la vitesse de transformation est proportionnelle seulement à la quantité de A, il suffit d'admettre, pour faire rentrer cette action dans les lois ordinaires de la cinétique chimique, que le corps décomposé n'est pas B, mais une combinaison de A et de B qui se forme à partir de ces deux corps avec une vitesse fort supérieure à la vitesse de décomposition. Certaines actions purement chimiques peuvent être ramenées aux lois ordinaires par cet artifice, et il ne paraît pas illégitime d'expliquer ainsi la vitesse de réaction des diastases organiques. Au reste, en présence d'alcali et *pour certaines concentrations* seulement, la vitesse de décomposition de H^2O^2 par le platine est indépendante de la concentration du corps à décomposer, tout comme la vitesse d'inversion du saccharose par la sucrase. Quoiqu'il en soit, il serait désirable qu'on trouvât, pour légitimer l'assimilation des actions catalytiques aux actions diastasiques, un ferment pour lequel la vitesse de transformation soit proportionnelle à la concentration du corps à transformer.

L'addition d'une petite quantité d'acide aux corps en réaction ne modifie pas le phénomène. Au contraire, une quantité même très faible d'alcali libre change considérablement la vitesse de la réaction, et nous allons ici pouvoir mettre en parallèle les influences qui modifient les actions catalytiques d'une part, diastasiques d'autre part. Il est malheureusement impossible pour le moment de fixer dans ce cas une valeur correcte à la vitesse de réaction. La vitesse brute que donne l'expérience n'est certainement pas celle que l'on doit considérer. Diverses expériences accessoires peuvent en effet montrer facilement que le corps H^2O^2 n'est pas tout entier à l'état libre dans le liquide, mais qu'il est partiellement engagé avec la base dans une combinaison où il joue le rôle d'acide : il se laisse par exemple moins facilement séparer de sa solution aqueuse par l'éther lorsque le liquide est alcalin. L'addition de H^2O^2 d'une part à l'eau pure, d'autre part à une solution

de soude, donne dans le second cas un abaissement du point de congélation beaucoup moindre que dans le premier. H^2O^2 en combinaison semble être plus stable qu'à l'état libre, et la quantité *a ou a—x*, qu'il faudrait introduire comme plus haut dans la formule de la vitesse de réaction, ne saurait être celle que donne le titrage.

En étudiant le phénomène en bloc, on voit que la destruction de l'eau oxygénée est beaucoup plus rapide en milieu alcalin qu'en milieu acide, et que la rapidité de l'action croît d'abord avec la quantité de base.

Il en est de même avec d'autres catalysateurs tels que PbO^2, et les auteurs montrent que dans ce cas la vitesse de réaction doit être (en faisant quelques hypothèses sur le mécanisme de la réaction) proportionnelle au carré de la concentration des ions OH dans la liqueur, ou, ce qui revient au même pour des liqueurs étendues, au carré de la concentration de la base.

Lorsque la dose d'alcali augmente beaucoup, une grande partie de H^2O^2 est combinée et l'action se ralentit. La destruction de l'eau oxygénée, qui peut être 10 fois plus rapide en milieu faiblement alcalin qu'en milieu neutre, reprend sa valeur primitive dans une solution de soude normale. Il y a donc pour une certaine alcalinité faible un maximum d'action très net. Il est intéressant de constater que l'émulsine détruisant également l'eau oxygénée en présence des alcalis, il y a aussi pour ce phénomène une dose optima d'alcali, et les courbes par lesquelles on peut représenter les vitesses des deux réactions (de l'émulsine et du platine) en fonction de la quantité de base montrent une analogie frappante des deux phénomènes. Un maximum semblable se présente si l'on construit la courbe qui représente la vitesse de l'inversion du sucre par la sucrase en présence de quantités croissantes d'acide, comme l'ont montré les expériences de M. Fernbach.

Là ne se borne pas l'action des alcalis sur le phénomène étudié, car si l'activité du platine de Bredig augmente d'abord beaucoup en leur présence, elle ne tarde pas à décroître, même s'ils sont en quantité assez petite. C'est ainsi qu'une solution additionnée de 1/50 de molécule-gramme de soude par litre devient d'abord 10 fois plus active, mais après 22 heures tout excès d'activité a disparu, et la vitesse de la réaction continue encore à décroître ensuite.

Tous les électrolytes ont d'ailleurs sur la vitesse de la réaction une influence analogue : 1/2000 de molécule-gramme par litre de Na^2HPO^4 ramène cette vitesse à 1/2 de sa valeur primitive, 1/50 de molécule-gramme de HCl après 18 heures de contact, à 1/10 de cette même valeur. Les acides paraissent à ce point de vue particulièrement actifs, mais non également pour un même nombre de molécules d'acide, ni non plus pour un même nombre d'ions H libres dans le liquide (ou, si

on préfère, pour des quantités invertissant un même poids de sucre dans le même temps).

L'analogie de cette influence des électrolytes avec celle qu'ils exercent sur l'action des diastases est frappante. Elle n'est d'ailleurs pas superficielle. La solution de platine, comme celle des diastases est colloïdale. Dans de telles solutions, un grand nombre de corps amènent la séparation du corps actif à l'état de flocons qui se précipitent lentement. De là résulte dans les deux cas une diminution d'activité.

A l'état colloïdal, commun aux solutions métalliques et à celles des diastases paraissent se rattacher d'autres propriétés qui les rapprochent les unes des autres. C'est ainsi qu'il ne suffit pas que deux solutions de platine soient également concentrées pour être également actives. Même lorsque la solution n'est souillée d'aucune impureté, il faut compter que son activité variera avec l'*état physique* dans lequel le métal se trouve dans le liquide, c. a. d. avec l'âge de la solution, son histoire antérieure, etc...

Lorsqu'on dilue une même solution, son activité décroît pour un même volume, non toutefois en raison inverse de la concentration. Les concentrations de métal étant C_1 et C_2 et les constantes K des vitesses de réaction correspondantes K_1 et K_2, on a $\frac{K_2}{K_1} = \left(\frac{C_2}{C_1}\right)^b$, ce qu'on peut écrire $\log K_1 - b \log C_1 = C^{te}$. b est voisin de 3/2. Il semble qu'il y ait là une différence avec les diastases, pour lesquelles on admet que $b = 1$. En revanche, les auteurs font ressortir la coïncidence curieuse de cette formule avec celle qui donne le temps nécessaire pour réduire à une fraction donnée du nombre primitif, le nombre des spores de charbon soumises à l'influence du sublimé [1].

Lorsqu'on élève la température d'une solution de diastase, l'activité de cette substance augmente, puis à une température plus élevée la diastase devient inactive. Sans que son activité soit limitée entre les températures où s'exerce l'action des diastases ordinaires, le platine de Bredig semble soumis à des lois semblables. D'une part son activité augmente avec la température. Lorsque celle-ci croît en progression arithmétique, la constante K croît en progression géométrique. Elle obéit à la loi d'Arrhenius $\log \frac{K_2}{K_1} = A \frac{T_2 - T_1}{T_1 T_2}$ (T_1 T_2 températures absolues. $A = 5899$). D'autre part, un chauffage prolongé détruit peu à peu l'activité de la solution métallique, en sorte qu'il n'est pas douteux que dans des opérations de longue durée poursuivies à des températures assez élevées, le platine montrerait comme les diastases

1. V. Paul et Kronig. (*Zeitsch. f. phys. Chem.*) et Ikeda (*Zeitsch. f. Hyg.* 25 (1897).

une température optima d'activité. La solution de platine se montre donc ici seulement beaucoup plus stable que celles des diastases, mais semblable en ses propriétés.

Une autre propriété des plus curieuses, découverte par les auteurs du mémoire, et qui établit entre les métaux et les diastases une ressemblance bien inattendue, est celle que présentent les solutions de platine d'être paralysées dans leur action par un certain nombre de *poisons*. L'acide sulfhydrique, le sulfure de carbone à des doses très faibles arrêtent toutes les actions caractéristiques de la solution. Le sublimé agit de même à des concentrations comparables à celles qui arrêtent l'action de l'invertine. Plus curieuse encore est l'action de l'acide cyanhydrique, car d'une part des traces de ce corps ralentissent ou même arrêtent complètement l'activité de la solution (1/1000000 de molécule-gramme par litre fait encore sentir son influence) : d'autre part, l'activité de la solution reparaît si on laisse le poison s'évaporer à l'air. Une action identique a été constatée sur les diastases organiques qui, dans cette circonstance comme dans une autre qui a été signalée plus haut, sont d'ailleurs atteintes dans leur action sur l'eau oxygénée avant de l'être dans leur action spécifique.

Telles sont les propriétés remarquables découvertes par les auteurs du mémoire et tels sont aussi les rapprochements que cette étude leur a suggérés. Il résulte de quelques expériences que les solutions d'autres métaux présenteraient dans l'ensemble des propriétés analogues, avec des différences qu'il serait peut-être intéressant d'étudier. L'étude de l'action du platine sur le mélange d'oxygène et d'hydrogène, actuellement en cours, donnera certainement aussi des résultats intéressants. Ces études fourniront probablement plus d'une transition entre les propriétés des solutions de platine et celles des diastases. Elles permettront aussi de donner une base à une étude générale de la catalyse.

A l'aide de ces études, à l'aide aussi d'autres travaux dans ce moment dans une voie toute différente et qui promettent de nous renseigner sur la nature de ces solutions colloïdales qui jouent un si grand rôle dans les phénomènes diastasiques, nous paraissons approcher du moment où se classeront et s'expliqueront les propriétés si singulières des diastases solubles organiques.

H. Mouton.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

Le Gérant : G. Masson.

14me ANNÉE SEPTEMBRE 1900 No 9

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES SUR LA SPERMOTOXINE

Par S. METALNIKOFF

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

La spermotoxine est un de ces poisons cellulaires (cytotoxines) qui se développent dans le sang de l'animal après injection des éléments cellulaires correspondants.

Ainsi des injections sous-cutanées ou intra-péritonéales de sang de lapin au cobaye produisent, dans le sang de ce dernier, une toxine spécifique qui dissout les globules rouges du lapin.

On a obtenu par le même procédé des sérums toxiques pour les spermatozoïdes, pour l'épithélium vibratile, pour les leucocytes, etc.

Tous ces sérums sont strictement spécifiques; ainsi la spermotoxine n'est guère toxique pour les autres éléments cellulaires.

Nous croyons pouvoir ne pas nous arrêter sur l'historique de la question, qu'on peut trouver exposé dans les travaux récents de MM. Metchnikoff, Bordet, Ehrlich et Morgenroth.

Il suffit de noter que tous les sérums toxiques agissent par deux substances qu'ils contiennent : 1° par l'alexine, présente dans le sérum de l'animal neuf, et 2° par la substance sensibilisatrice (ou intermédiaire d'Ehrlich), qui se développe dans le sérum des animaux injectés par les éléments cellulaires

1. *Berl. klin. Wochen.*, 1900, n° 21.

correspondants. Ce n'est qu'en présence de ces deux substances que le sérum est actif.

I

SPERMOTOXINE

C'est en 1899 que Landsteiner[1] découvrit la spermotoxine en injectant des spermatozoïdes du taureau au lapin. En même temps, Metchnikoff découvrit le sérum spermotoxique de l'homme et du lapin. Enfin, au commencement de cette année parut une étude intéressante de Moxter[2], qui obtint un sérum spermotoxique par l'injection de spermatozoïdes du mouton au lapin.

De mon côté j'ai préparé un sérum toxique pour les spermatozoïdes du cobaye.

Dans mes expériences, j'ai employé les testicules et l'épididyme du cobaye; je les broyais dans une petite quantité d'eau physiologique: je faisais passer cette émulsion à travers une toile métallique.

Après deux ou trois injections, le sérum du lapin avait acquis des nouvelles propriétés assez compliquées, et que je ne pus démêler de prime abord, parce que le sérum du lapin neuf est plus ou moins toxique pour les spermatozoïdes du cobaye. Ceux-ci, introduits dans le sérum de lapin en proportion de 1 pour 10 (1 goutte de sperme sur 10 gouttes de sérum) meurent généralement en 4-5 minutes.

Le sérum des lapins qui avaient été injectés avec le sperme de cobaye tue les spermatozoïdes en 3-4 minutes. La différence est donc si insignifiante qu'il est impossible de distinguer le sérum du lapin neuf de celui du lapin traité. Mais il suffit de chauffer les deux à 56° pour que la différence entre eux saute aux yeux. Le sérum du lapin neuf, chauffé à cette température, perd ses propriétés toxiques, qui ne peuvent réapparaître sous aucune condition; par contre, le sérum du lapin traité, chauffé à 56°, redevient toxique quand on y ajoute du sérum de cobaye (ce sérum n'est pas du tout toxique pour les spermatozoïdes du cobaye lui-même).

Ainsi, bien que la toxicité des deux sérums, de celui du

1. *Centr. f., Bacter.* 1899.
2. *Deutsch. med. Wochen.*, 1900, n° 4.

lapin neuf et du lapin traité, soit presque égale, néanmoins la différence entre ces sérums est très accentuée : le premier ne contient pas de substance sensibilisatrice (ou *Immunkörper*) et ne peut être reconstitué par l'addition de l'alexine, tandis que le second sérum contient la substance sensibilisatrice, et sa toxicité peut être facilement restituée.

Il est évident que le sérum du lapin neuf est toxique grâce à l'alexine qu'il contient.

Le sérum du lapin traité contient, en plus de l'alexine, encore une nouvelle substance, commune à toutes les cytotoxines : la substance sensibilisatrice.

Mais celle-ci ne peut agir qu'en présence de l'alexine qui se trouve aussi dans le sérum du cobaye neuf.

Dans quelles proportions ces deux substances communiquent-elles au sérum sa plus grande toxicité?

Afin de résoudre cette question, je prenais d'un côté le sérum d'un lapin traité, sérum chauffé à 56° et ne contenant par suite que la substance sensibilisatrice seule, et de l'autre côté le sérum de cobaye, sérum contenant l'alexine seule. Je prenais différentes quantités des deux, et je les mélangeais en ajoutant une quantité donnée de spermatozoïdes de cobaye.

Je définissais le degré de toxicité par le laps de temps écoulé avant que tous les spermatozoïdes du mélange soient tués.

Le tableau suivant fait voir les proportions dans lesquelles agissent les substances sensibilisatrices et l'alexine combinées, et le temps qu'elles prennent pour tuer les spermatozoïdes.

Lorsque le sérum spermotoxique, chauffé à 56°, du lapin traité, et le sérum du cobaye neuf sont mélangés dans la proportion de

10 à 1	les spermatozoïdes	meurent en	40 minutes.
8 à 2	—	—	16 —
6 à 4	—	—	10 —
5 à 5	—	—	9 à 10 min.
4 à 6	—	—	7 à 8 min.
2 à 8	—	—	5 à 6 min.
1 à 10	—	—	5 à 5 m. 1/2.
1 à 12	—	—	5 à 5 m. 1/2.
1 à 15	—	—	5 minutes.
1 à 20	—	—	5 —
1 à 25	—	—	5 1/2 à 6 m.
1 à 30	—	—	9 à 10 min.
1 à 40	—	—	10 minutes.

Ainsi l'optimum de l'action du sérum est atteint quand la substance sensibilisatrice est à l'alexine en proportion de 1/13, 1/20. Dans certains cas j'ai observé l'optimum entre 1/10 et 1/20, dans d'autres entre 1/15 et 1/25.

Tous ces chiffres n'ont évidemment qu'une valeur approximative, car nous ne pouvons obtenir ni l'alexine ni la substance sensibilisatrice à l'état de pureté. Nous n'avons que des sérums contenant ces substances en différentes quantités.

Il est donc indispensable d'employer des sérums à propriétés plus ou moins fixes.

J'employais d'un côté le sérum du lapin injecté 3 fois en 15 jours, et de l'autre du sérum frais de cobaye neuf.

Dans ces conditions, j'obtenais constamment des chiffres plus ou moins semblables. Ainsi il fallait toujours employer l'alexine en quantité 10, 15 et 20 fois plus grande que la substance sensibilisatrice pour avoir l'effet maximum.

Si la quantité d'alexine joue un si grand rôle dans l'action toxique des sérums ordinaires, et probablement des sérums bactéricides, on se demande involontairement si ces alexines sont toujours en quantité suffisante dans l'organisme, et si leur quantité ne change pas sous l'influence de différentes conditions?

Je suis tombé par hasard sur un animal qui m'a prouvé que les alexines pouvaient non seulement varier dans leur quantité, mais qu'elles pouvaient faire complètement défaut dans le sang.

J'injectai deux fois des spermatozoïdes à un lapin n° 3. L'opération fut mal faite, car il eut un énorme abcès, de la grosseur d'une pomme, qui perça en donnant une grande quantité de pus. Après quoi l'animal se rétablit promptement, et je lui fis encore deux injections de spermatozoïdes. Je retirai un peu de sang pour en préparer du sérum.

Quel fut mon étonnement quand je dus constater que le sérum de ce lapin n'était pas du tout toxique pour les spermatozoïdes du cobaye, tandis que même le sérum d'un lapin neuf l'est d'une façon très prononcée! Mais il a suffi d'ajouter un peu de sérum de cobaye neuf pour rendre très toxique celui du lapin en question.

Il est donc évident que le sérum de ce lapin ne contenait que la substance sensibilisatrice et pas d'alexine.

Ce lapin est encore vivant, et j'ai étudié plusieurs fois son

sérum. J'ai observé que la quantité d'alexines y augmentait peu à peu, et qu'il devenait de plus en plus toxique, bien que les injections de spermatozoïdes ne fussent plus renouvelées.

Au commencement de cette année, Moxter publia un mémoire dans lequel il se prononce contre la spécificité des cytotoxines.

Il tire cette conclusion : 1° de ce fait, que le sérum du lapin, ayant reçu une injection d'épididyme de mouton, acquiert, à côté de la propriété spermotoxique, un pouvoir hémolytique ; 2° du fait que le sérum perd non seulement sa propriété spermotoxique, mais aussi son pouvoir hémolytique quand on ajoute une quantité suffisante de spermatozoïdes. Il conclut donc que c'est la même substance qui dissout les globules rouges du mouton et tue ses spermatozoïdes.

Dans son dernier mémoire, Metchnikoff [1] a prouvé que l'opinion de Moxter est erronée. De mon côté j'ai fait plusieurs expériences qui aboutissent au même résultat.

Si on injecte au lapin un mélange de spermatozoïdes et de sang défibriné de cobaye, le sérum de ce lapin devient très spermotoxique et hémolytique en même temps.

Je chauffai ce sérum et le divisai en deux parties. L'une fut gardée avec une grande quantité de globules rouges pendant 2 heures à 37°, et l'autre fut additionnée d'une grande quantité de spermatozoïdes, et gardée de même pendant 2 heures à 37°.

Les deux portions furent centrifugées et j'examinai leur action.

Le sérum n° 1, saturé de globules sanguins, ne dissolvait plus les globules rouges quand on ajoutait de l'alexine (sérum du cobaye neuf). Ainsi toute la substance sensibilisatrice de l'hémotoxine était fixée ; néanmoins ce sérum continuait d'immobiliser les spermatozoïdes aussi vite qu'avant sa saturation par les globules rouges (expérience 3).

Il est donc évident que la substance sensibilisatrice de la spermotoxine était restée intacte dans le sérum, sans être fixée par les globules rouges.

Le sérum n° 2, saturé de spermatozoïdes, présente une action quelque peu différente.

Tandis que celui du lapin traité dissout les globules rouges

1. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1900, n° 6.

en 4-5 minutes (expérience 2) — le sérum n° 2, saturé de spermatozoïdes — ne les dissout qu'après 1 1/2, 2 et même après 3 heures (expérience 5). Les spermatozoïdes avaient donc fixé non seulement la substance sensibilisatrice de la spermotoxine, mais aussi celle de l'hémotoxine.

Donc, tandis que les globules rouges fixent la substance sensibilisatrice de l'hémotoxine seule, — les spermatozoïdes fixent les deux substances sensibilisatrices.

C'est justement ce fait qui amena Moxter à cette conclusion erronée que les deux toxines ont une même substance sensibilisatrice.

Pour être plus bref, je vais désigner le sérum chauffé à 56° et saturé par le sang de cobaye par — sér. n° 1 ch. 56° — et le sérum saturé par les spermatozoïdes — sér. n° 2 chauf. 56°.

Expérience n° 1....	4 gouttes de sérum n° 1, chauffé à 56°. 6 gouttes de sérum de cobaye neuf. 1 goutte de sang de cobaye.	Ne dissout pas les globules de sang du cobaye.
— 2....	4 gouttes de sérum spermotoxique et hémol. du lapin, chauffé à 56°. 6 gouttes de sérum de cobaye neuf. 1 goutte de sang de cobaye.	Les dissout en 4 à 5 minutes.
— 3....	4 gouttes de sérum n° 1, chauffé à 56°. 6 gouttes de sérum de cobaye neuf. 1 goutte de spermatozoïdes de cobaye.	Tue les spermatozoïdes en 4 min.
— 4....	4 gouttes de sérum spermotoxique et hémol. du lapin, chauffé à 56°. 6 gouttes de sérum de cobaye neuf. 1 goutte de spermatozoïdes du cobaye.	Tue en 4 minutes.
— 5....	4 gouttes de sérum n° 2, chauffé à 56°. 6 gouttes de sérum de cobaye neuf. goutte de sang de cobaye.	Dissout après 1 h. 1/2.

III

ANTISPERMOTOXINE

C'est Metchnikoff qui obtint le premier l'antispermotoxine[1] en injectant le sérum spermotoxique du cobaye au lapin.

Après trois injections, le sérum du lapin neutralisait le sérum spermotoxique du cobaye en proportion de 8 : 1 et même de 2 : 1.

Dans mes expériences, j'ai procédé à l'inverse : j'injectais le sérum spermotoxique du lapin sous la peau ou dans le péritoine des cobayes (mâles, femelles et châtrés). Après 3,4, 5 et 10 injections, je prenais le sang du cobaye ainsi traité pour étudier ses propriétés antitoxiques.

Deux cobayes seulement (un mâle et un châtré) me fournirent après trois injections un sérum neutralisant à un très faible degré le sérum spermotoxique du lapin. J'obtenais une neutralisation en ajoutant 20-25 volumes de sérum antispermotoxique pour une partie de spermotoxine. Je continuai donc les injections de sérum spermotoxique dans l'espoir d'obtenir un sérum antispermotoxique plus actif. Mais au lieu d'un renforcement, j'obtins la disparition complète de l'antispermotoxine.

Après 5 injections, le sang des cobayes ne présentait plus de pouvoir antispermotoxique, même dans les proportions de 1/25 ou 1/30. D'autres cobayes, ayant subi plusieurs injections de spermotoxines, ne fournirent plus du tout d'antispermotoxine.

On sait que les sérums toxiques contiennent, à côté des alexines, des substances sensibilisatrices spécifiques. Donc, pour obtenir une neutralisation complète du sérum toxique, il faut qu'il y ait à côté de la substance neutralisant l'alexine, l'antialexine, une autre substance neutralisant la substance sensibilisatrice, c'est-à-dire une substance antisensibilisatrice.

Il était possible que mon sérum ne produisît que l'antialexine, ce qui n'est pas suffisant pour une neutralisation complète du sérum spermotoxique.

En effet, si l'antialexine neutralise l'alexine du sérum spermotoxique, et si la substance sensibilisatrice reste libre, le sérum ne doit pas perdre son pouvoir toxique, car sa substance sensibilisatrice se combine avec l'alexine du cobaye.

1. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1900, n° 1.

Si se raisonnement est juste, le sérum antitoxique de mes cobayes, chauffé à 56°, c'est-à-dire débarrassé de l'alexine, devrait neutraliser la spermotoxine.

L'expérience a pleinement confirmé cette supposition.

Les sérums des cobayes inoculés plusieurs fois avec de la spermotoxine, ces mêmes sérums qui n'avaient eu aucune action neutralisante, neutralisaient très bien après un chauffage à 56° dans la proportion de 1/3 et de 1/5 :

1 goutte de sérum spermotoxique du lapin. 10 gouttes de sérum antitoxique de cobaye.	Tue en 2 min. 1/2.
1 goutte de sérum spermotoxique du lapin. 10 gouttes de sérum antitoxique du cobaye, chauffé à 56°.	Ne tue pas les spermatozoïdes.

Il est donc évident qu'il ne s'était produit dans le sang de mes cobayes que de l'antialexine ; celle-ci neutralisait l'alexine seule du sérum spermotoxique, sans attaquer la substance sensibilisatrice.

L'expérience suivante le démontre particulièrement :

1 goutte de sérum spermotoxique. 10 gouttes de sérum antitoxique du cobaye, chauffé à 56°. 3 gouttes de sérum de cobaye neuf.	Tue les spermatozoïdes en 10 minutes.
1 goutte de sérum spermotoxique. 10 gouttes de sérum antitoxique, chauffé à 56°. 3 gouttes de sérum de cobaye neuf, chauffé à 56°.	Ne tue pas.

Dix gouttes de sérum antitoxique chauffé à 56°, ajoutés à une goutte de sérum spermotoxique, neutralisent complètement toute l'alexine. Les spermatozoïdes introduits dans ce mélange restent mobiles pendant très longtemps. Mais si l'on ajoute à ce mélange quelques gouttes de sérum d'un cobaye neuf, c'est-à-dire une quantité suffisante d'alexine, les spermatozoïdes sont aussitôt immobilisés. Donc, la substance sensibilisatrice était à l'état libre.

Ainsi, en faisant agir le sérum antitoxique chauffé ou non chauffé, nous pouvons toujours définir si nous avons affaire avec l'antialexine ou avec la substance antisensibilisatrice.

Presque tous mes cobayes ayant reçu de la spermotoxine fournirent du sérum ne contenant que de l'antialexine ; deux

seulement fournirent une très petite quantité de substance antisensibilisatrice.

Bordet a indiqué ce fait dans son dernier mémoire[1] : « On constate par de telles expériences que la fonction antisensibilisatrice de notre antitoxine est peu développée : il faut en effet, en moyenne, quinze parties d'antitoxine pour neutraliser la sensibilisatrice contenue dans une partie de sérum hémolytique qui a été chauffé à 55°. Bien plus remarquable est l'intensité de la fonction antialexique de l'antitoxine. »

Comment expliquer tout de même ce fait que les animaux auxquels on a injecté des toxines produisent des antialexines en grande quantité, et ne produisent que très peu ou même point de substance antisensibilisatrice?

Il me semble que la cause de ceci réside en ce que la substance sensibilisatrice a la propriété de se fixer sur les éléments cellulaires correspondants. En effet, nous avons vu plus haut que la sensibilisatrice du sérum hémolytique se fixe non seulement sur les globules rouges, mais aussi sur les spermatozoïdes.

En se fixant sur les éléments cellulaires, la substance sensibilisatrice par cela même est éliminée du sang ; il est cependant probable que les éléments du sang, les phagocytes, jouent un rôle dans l'élaboration des antitoxines. Pour obtenir une substance antisensibilisatrice, il faudrait avoir une très grande quantité de substance sensibilisatrice, il faudrait que tous les éléments cellulaires correspondants en soient saturés et qu'il en reste encore dans le sang.

IV

AUTOSPERMATOXINE

On croyait jusqu'ici que, pour obtenir des cytotoxines, il fallait injecter les éléments cellulaires d'une espèce animale à une autre espèce. Ainsi, afin d'obtenir une hémotoxine pour le lapin, il faut injecter ses globules sanguins à un animal d'autre espèce, par exemple à un cobaye ou à un chien, mais en aucun cas au lapin lui-même.

Pourtant MM. Ehrlich et Morgenroth[2] ont démontré tout dernièrement qu'il n'en était pas tout à fait ainsi. Ils injectèrent

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1900, n° 5.
2. *Berl. kl. Woch.*, 1900, n° 21.

à une chèvre du sang (dilué dans de l'eau) d'une autre chèvre, et obtinrent un sérum toxique pour beaucoup d'animaux de la même espèce. Ainsi la chèvre peut fournir du sérum hémotoxique pour une autre chèvre (isotoxine), mais ne peut en produire pour ses propres éléments cellulaires (autotoxine).

S'il en est ainsi pour les globules sanguins rouges, il n'en est guère de même pour les spermatozoïdes, car on obtient très facilement leurs autotoxines. Quand on injecte les spermatozoïdes d'un cobaye sous la peau ou dans le péritoine d'un autre cobaye, on remarque que, déjà après la première injection, le sérum du cobaye inoculé devient faiblement toxique, non seulement pour les spermatozoïdes d'autres cobayes, mais aussi pour ceux du cobaye inoculé lui-même.

L'autotoxicité augmente beaucoup après la 2e et 3e injection. En ajoutant 10 gouttes de sérum à une goutte de spermatozoïdes, on les immobilise en 3-4 minutes.

Cette autotoxine est soumise aux lois générales des cytotoxines. Elle perd ses propriétés toxiques étant chauffée à 55°, et les réacquiert facilement après l'addition du sérum d'un cobaye neuf.

J'ai injecté des mâles, des femelles et des cobayes châtrés; tous produisaient un sérum autotoxique, actif à peu près au même degré.

Ce qui est très curieux, c'est que le cobaye, dont le sang contient des toxines très actives pour ses propres spermatozoïdes *in vitro*, présente lui-même des spermatozoïdes aussi mobiles et vivants que le cobaye neuf. Introduits dans de l'eau physiologique, ils y vivent très longtemps.

Pourtant si l'on introduit ces spermatozoïdes dans le sérum d'un cobaye neuf, ils meurent très vite (en 10-20 minutes), tandis que les spermatozoïdes du cobaye neuf vivent dans le sérum normal du cobaye pendant quelques heures.

Il est évident que les spermatozoïdes étaient sensibilisés par la substance sensibilisatrice circulant dans le sang du cobaye. Donc si les spermatozoïdes n'étaient pas tués par les autotoxines, c'était dû exclusivement à ce que le sang ne contenait pas d'alexine libre, celle-ci étant renfermée dans l'intérieur des phagocytes, d'après l'opinion émise plusieurs fois par Metchnikoff.

Cela explique facilement pourquoi les autotoxines sont actives *in vitro* et ne le sont pas dans l'organisme.

Les éléments cellulaires sont détruits dans le sérum *in vitro*: c'est parce qu'il contient les alexines aussi bien que la substance sensibilisatrice. Au contraire, dans l'organisme vivant, tous les éléments cellulaires sont intacts, les alexines sont donc renfermées dans les leucocytes, et la substance sensibilisatrice seule circule dans le sang et se fixe sur les spermatozoïdes.

Voilà pourquoi ceux-ci sont sensibilisés et non tués.

D'autres expériences confirment cette conclusion.

Si l'on injecte dans le péritoine d'un cobaye, dont le sang est autotoxique, des spermatozoïdes vivants dans du liquide physiologique, et si l'on examine ensuite l'exsudat péritonéal, dans 3, 4, 5 minutes on voit ce qui suit. Aussitôt après l'injection, il se produit une rapide phagolyse; les spermatozoïdes sont encore vivants : 2, 3 et 5 minutes après que la phagocytose a eu lieu, tous les spermatozoïdes sont tués.

Tout autre est le tableau qui se présente si le même cobaye à sang autotoxique est d'abord traité par des injections de liquide physiologique ou de petites doses de sérum leucotoxique.

Dans ce cas la phagolyse est très insignifiante après l'injection des spermatozoïdes vivants dans le péritoine, et ils y vivent pendant plus d'une heure. La phagocytose s'établit très rapidement. Il se produit une vraie lutte entre les phagocytes et les spermatozoïdes. Beaucoup de spermatozoïdes sont englobés vivants; tandis que leur corps est déjà renfermé dans le leucocyte, leur flagellum se meut avec vitesse en dehors.

Cette même expérience peut être modifiée.

Avec un tube effilé, on retire un peu de liquide péritonéal au cobaye préparé comme je viens de le décrire. On garde ce liquide pendant quelque temps à la glacière, ce qui tue assez vite les leucocytes. Si on ajoute à ce liquide une goutte de spermatozoïdes, ils meurent après 3-5 minutes.

Si l'on injecte au même animal des spermatozoïdes dans le péritoine et si l'on retire après quelques minutes du liquide péritonéal contenant une quantité de leucocytes intacts, et si on met le liquide dans une goutte suspendue, on voit que les spermatozoïdes y vivent assez longtemps : 20-30 minutes.

J'ai de même observé plusieurs fois que les spermatozoïdes

mouraient plus vite dans la cavité péritonéale lorsqu'on les y introduisait dans de l'eau physiologique *non* chauffée, ce qui renforce la phagolyse.

Au contraire, en injectant les spermatozoïdes dans le péritoine avec de l'eau physiologique, chauffée à 36°, on observe qu'ils résistent plus longtemps.

Tout ceci confirme l'opinion plusieurs fois émise par Metchnikoff, d'après laquelle les cytotoxines se produiraient dans les phagocytes, et ne seraient que des ferments digestifs intracellulaires.

J'ai injecté le sérum autotoxique à plusieurs cobayes (mâles, femelles et châtrés) dans l'espoir d'obtenir une antitoxine. Mais le sérum chauffé à 56° ne neutralisait point l'autotoxine.

A côté des injections intrapéritonéales, j'en fis des sous-cutanées de spermatozoïdes vivants à un cobaye à sang fortement spermotoxique. C'était le même cobaye dans le péritoine duquel les spermatozoïdes mouraient en quelques minutes.

Il se produisait généralement au point d'injection un petit œdème. J'en retirais un peu d'exsudat à l'aide d'un tube effilé, à plusieurs intervalles précis. Je trouvais dans cet exsudat beaucoup de spermatozoïdes vivants à côté de globules rouges et une très petite quantité de leucocytes.

Même après 2 heures, les spermatozoïdes étaient complètement vivants sous la peau du cobaye à sérum spermotoxique.

Ensuite la quantité des spermatozoïdes diminuait rapidement et ils disparaissaient de l'œdème. Il est probable qu'étant mobiles, ils se transportaient dans toutes les directions sous la peau des cobayes.

Quelquefois cette disparition des spermatozoïdes s'opérait beaucoup plus vite : déjà après 20-30 minutes, il était impossible d'en retrouver un seul à l'endroit de l'injection.

Ceci confirme encore l'opinion de Metchnikoff sur l'origine phagocytaire des cytotoxines.

Ce sont surtout les faits suivants qui corroborent cette manière de voir.

Premièrement : *la destruction rapide des spermatozoïdes* dans le péritoine du cobaye spermotoxique *lorsqu'il y a phagolyse*, et, par contre, la destruction lente, lorsque la phagolyse est empêchée par n'importe quel moyen dans le péritoine du même cobaye.

Secondement, la mort rapide des spermatozoïdes dans le liquide péritonéal, dans lequel les phagocytes ont été préalablement tués par le froid, et, inversement, la résistance de ces spermatozoïdes dans le liquide péritonéal, dans lequel les leucocytes ont été conservés intacts.

Troisièmement, la résistance prolongée des spermatozoïdes sous la peau du cobaye spermotoxique, condition dans laquelle il n'y a pas de phagolyse, comme on sait.

Enfin cette opinion est confirmée par le fait que l'autospermotoxine est facilement obtenue, tandis qu'on n'a pas pu obtenir d'autotoxine pour les globules rouges, comme l'ont démontré Belfanti, Carbone et Bordet, et comme je l'ai observé moi-même en injectant au lapin du sang du lapin même.

En effet, les spermatozoïdes sont rapidement englobés par les phagocytes après l'injection; tandis qu'il n'y a pas de phagocytose après l'injection des globules rouges. C'est pourquoi il y a production d'autotoxines dans le premier cas et non pas dans le second.

On pourrait supposer qu'il n'y a pas d'autotoxine parce que l'antiautotoxine se produit très rapidement et neutralise l'autotoxine; par suite on ne trouve que de l'antiautotoxine dans le sang de ces animaux.

Pour résoudre cette question, j'ai injecté de l'autospermotoxine à plusieurs cobayes (mâles, femelles, châtrés). A mon grand étonnement, je n'ai pu du tout obtenir de l'antiautotoxine. Même le sérum de ces animaux, chauffé à 56°, ne pouvait neutraliser le sérum autotoxique.

En terminant j'exprime à M. Metchnikoff ma reconnaissance pour le sujet d'étude si intéressant qu'il m'a donné et pour son appui constant pendant mon travail.

ÉTUDE COMPARÉE DU VIBRION SEPTIQUE

ET DE

LA BACTÉRIE DU CHARBON SYMPTOMATIQUE

Par MM. E. LECLAINCHE et H. VALLÉE

Le vibrion septique et le *Bacterium Chauvœi* présentent morphologiquement d'étroites ressemblances. Les conditions étiologiques bien définies qui président à l'évolution de la septicémie gangréneuse se retrouvent pour le charbon symptomatique, et les lésions de ces deux maladies offrent de parfaites analogies.

On a donc été conduit à rapprocher, et même parfois à identifier, dans la classification bactérienne, les deux agents pathogènes.

En 1887, Roux et Chamberland démontrent qu'il est possible d'immuniser contre la septicémie, avec les substances solubles sécrétées par le vibrion. L'année suivante, Roux vaccine, par un procédé identique, les cobayes contre le charbon symptomatique ; la parenté entre les deux microbes semble devoir s'affirmer d'autant plus, que les cobayes rendus réfractaires au charbon bactérien résistent souvent à l'inoculation du vibrion septique.

Kitasato [1], ayant réussi à vacciner des cobayes contre le charbon symptomatique avec des cultures affaiblies, éprouve les animaux avec le bacille de l'œdème malin, et les voit tous succomber.

Duenschmann [2] reprend, en 1894, la question de l'analogie du vibrion septique et du *Bacterium Chauvœi*. Il étudie spécialement l'immunisation réciproque. Quatre cobayes et deux lapins solidement immunisés contre le charbon symptomatique résistent à l'épreuve par le vibrion septique. Cet expérimentateur obtient, chez le lapin, un sérum actif contre le charbon

1. Kitasato, Ueber den Rauschbrandbacillus und sein Culturverfahren, *Zeitschrift für Hygiene*, t. VI, 1889, p. 1057.
2. Duenschmann, Étude expérimentale sur le charbon symptomatique, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. VIII, 1894, p. 403.

symptomatique : or ce même sérum neutralise des doses mortelles de sang septique.

Au cours de nos recherches sur le charbon symptomatique, nous avons étudié les rapports du vibrion septique et du *Bacterium Chauvæi* au double point de vue des propriétés spéciales à ces microbes, et de l'immunité contre les maladies qu'ils déterminent.

Morphologie. — On ne saurait établir une différenciation nette entre les lésions de la septicémie et celles du charbon symptomatique, lorsqu'on opère avec des virus qui n'ont pas subi de modifications expérimentales (atténuation ou exaltation).

Il y a cependant des différences à noter dans les formes microbiennes trouvées au sein des lésions septiques et charbonneuses chez le cobaye.

Si l'autopsie est pratiquée très peu de temps après la mort, on ne trouve pas de formes longues, flexueuses, ni dans la sérosité de l'œdème, ni dans la tumeur musculaire des cobayes qui succombent au charbon symptomatique ; ce sont les formes droites, courtes, qui dominent; les formes en fuseau ou en raquette se trouvent aussi assez abondantes. Dans les lésions provoquées par un vibrion septique d'activité moyenne, on trouve toujours, au contraire, des formes longues, associées à des bacilles droits plus courts et à de rares articles sporulés.

Dans le péritoine des cobayes qui succombent à la septicémie, on rencontre, aussitôt après la mort, des formes longues très inégales et flexueuses du microbe. On obtient de fort belles préparations de vibrion en appliquant une lame à la surface du foie et en colorant par la méthode de Gram-Nicolle.

On ne constate jamais rien de semblable chez le cobaye tué par la bactérie du charbon symptomatique ; l'examen de la surface du foie révèle l'existence de formes relativement courtes, droites et de longueur sensiblement constante.

Cette méthode est excellente pour s'assurer si l'on dispose d'un virus symptomatique pur, exempt de souillure par le vibrion septique ; si l'on trouve dans le péritoine du cobaye inoculé des formes longues, on peut être assuré qu'on est en présence d'une infection surajoutée par le vibrion septique, et que ce microbe se trouvera associé, dans le sang du cœur, à la bactérie du charbon symptomatique.

Immunisation. — Les différentes méthodes d'immunisation sont applicables à la fois à la septicémie gangréneuse et au charbon symptomatique.

a) *Virus vaccins.* — Nous avons réussi à vacciner des cobayes contre la septicémie gangréneuse par un procédé analogue à celui indiqué par MM. Arloing et Cornevin pour le charbon symptomatique. Du sang septique, recueilli en ampoules scellées, est placé pendant 5 jours à l'étuve à 37°. Au bout de ce temps, tous les vibrions sont sporulés ; le sang est alors desséché en couches minces, dans des boîtes de verre stérilisées. Le produit de grattage reste très longtemps virulent. Pour préparer le vaccin, on mélange 1 partie, en poids, de poudre virulente à 1/2 partie d'eau ; le liquide, étalé sur le couvercle d'une boîte de Pétri, est porté à l'étuve à 92°, pendant 7 heures.

On obtient, après trituration de la pellicule qui recouvre la plaque de verre, une poudre brune qui, inoculée à des cobayes de forte taille, les tue à la dose de 5 centigrammes en moins de 20 heures. Des doses inférieures à 1 centigramme, diluées dans de l'acide lactique à 1 pour 5, tuent comme le virus non chauffé.

Les cobayes qui reçoivent 1 ou 2 centigrammes de poudre vaccinale ne présentent que des accidents locaux sans gravité, ils résistent, 15 jours plus tard, à l'inoculation de doses mortelles de virus. Les cobayes qui ont reçu 2 centigrammes de vaccin résistent à l'inoculation de 1 goutte entière de sérosité septique ; ceux qui reçoivent 1 centigramme de vaccin résistent, dans la proportion de 1 sur 2, à l'épreuve par 1/2 goutte de sérosité virulente qui tue les témoins en 15 heures.

b) *Toxines.* — MM. Roux et Chamberland ont démontré qu'il est possible d'immuniser les cobayes contre la septicémie en leur inoculant, à plusieurs reprises, des cultures stérilisées par le chauffage à 105°-110° pendant 10 minutes, ou le liquide que l'on obtient en filtrant sur porcelaine les jus virulents qui s'écoulent des lésions d'un animal mort de septicémie.

Roux a fait, peu de temps après cette importante constatation, une démonstration identique pour le charbon symptomatique.

c) *Sérothérapie.* — En 1898, l'un de nous [1] obtient un sérum

1. E. Leclainche, Sur la sérothérapie de la gangrène gazeuse, *Archives médicales de Toulouse*, 1898, n° 21, p. 397.

immunisant contre le vibrion septique, chez l'âne traité par des inoculations multiples de jus virulents dans les veines et dans le tissu musculaire [1]. Ce sérum possède des propriétés si énergiques que la sérothérapie préventive est pratiquement réalisable, et « qu'il devient facile d'immuniser à la fois les blessés contre le tétanos et contre la gangrène ».

Un mélange de 2 c. c. de sérum et de 5 gouttes de sérosité septique ne produit aucun accident chez le cobaye, alors que les témoins succombent en 8-15 heures. « Les animaux qui ont reçu le mélange sérum-virus ne possèdent aucune immunité : inoculés après 2, 10 ou 20 jours avec une dose faible de virus, ils succombent aussi sûrement et aussi rapidement que les témoins. »

Tout ce que nous venons de dire de la sérothérapie de la gangrène gazeuse s'applique à celle du charbon symptomatique, ainsi que nous l'avons démontré avec le cobaye, et que M. Arloing l'a constaté, chez le mouton et chez le bœuf.

Kitt réalise, en 1899, l'immunisation du cheval contre le charbon symptomatique par des injections intra-veineuses de jus virulents; il montre que les solipèdes constituent les sujets de choix pour la production d'un sérum rapidement immunisant. Nous avons obtenu aussi d'excellents résultats en immunisant des chevaux par des injections intra-veineuses de jus virulents ou de cultures du *B. Chauvœi* en bouillon Martin.

Donc, au point de vue des méthodes d'immunisation, le vibrion septique et le *B. Chauvœi* se comportent de façon identique.

L'immunité conférée contre le charbon symptomatique permet-elle aux animaux de résister à la gangrène gazeuse?

On ne peut protéger le cobaye contre le vibrion septique par l'inoculation préventive de fortes doses d'un sérum immunisant contre le charbon symptomatique. Les cobayes qui reçoivent 5 et même 10 c. c. de sérum symptomatique, puis, 24 heures après, une goutte de sang ou de sérosité septiques, meurent aussi vite que les témoins, tandis que les cobayes traités avec

1. L'inoculation intra-veineuse de cultures en bouillon Martin donne aussi un sérum très actif.

des doses égales ou cinq fois moindres de sérum anti-charbonneux résistent bien à l'épreuve par le charbon symptomatique.

Exp. — *Cob.* 297 *et* 298 reçoivent préventivement 5 c. c. de sérum anticharbonneux (saignée du 3 mars 1900).

Cob. 303 *et* 304 reçoivent préventivement 5 c. c. de sérum anticharbonneux (saignée du 1er mai).

24 heures après l'injection du sérum, les cobayes 297 et 303 reçoivent, ainsi qu'un témoin, 1 goutte de jus septique. Le cobaye témoin meurt en 10 heures; les deux sujets traités succombent en 12 heures. Les cobayes 298 et 304, éprouvés en même temps avec 3 gouttes de culture de charbon symptomatique, résistent bien; le témoin meurt en 16 heures.

L'expérience, plusieurs fois répétée, a toujours donné des résultats comparables [1]. Nous avons prié M. Nocard de vouloir bien étudier l'action de notre sérum anticharbonneux sur les vibrions septiques dont il dispose : les résultats qu'il a obtenus sont identiques aux nôtres : les cobayes inoculés préventivement avec le sérum succombent à la septicémie, tandis qu'ils résistent au charbon symptomatique.

D'autre part, nous avons recherché si l'immunité durable conférée aux animaux par une inoculation de virus atténué du charbon symptomatique, puis de virus fort, leur permet de résister à la septicémie. Dans plusieurs séries d'expériences, nous avons éprouvé, avec un vibrion d'activité moyenne, des cobayes immunisés avec des vaccins pulvérulents ou des vaccins purs liquides, et qui avaient résisté à l'épreuve de contrôle. Tous nos animaux ont succombé à la septicémie.

Nous sommes convaincu que si les auteurs qui ont traité cette question avant nous ont obtenu des résultats différents des nôtres, c'est qu'ils ont utilisé, pour leurs vaccinations, des virus à la fois symptomatiques et septiques.

Il ne faut pas oublier que la souillure par le vibrion septique des cadavres des cobayes morts de charbon symptomatique est rapide et presque certaine. En employant pour immuniser les animaux des jus virulents actifs ou filtrés sur porcelaine, on s'expose à leur donner à la fois les microbes symptomatique et septique ou leurs toxines, et par suite à les immuniser, plus ou

1. Pour nos épreuves, nous avons utilisé des vibrions de diverses provenances (cheval, cobaye, homme); notre sérum antigangréneux s'est toujours montré actif contre ces vibrions.

moins inégalement, contre les deux maladies à la fois. C'est sans aucun doute en raison de ces souillures que l'on voit la moitié des animaux vaccinés à l'aide des toxines contre le charbon symptomatique résister aussi à l'épreuve par le vibrion septique.

Duenschmann obtient chez le lapin un sérum actif à la fois contre le charbon symptomatique et la septicémie. Mais si l'on analyse les expériences de l'auteur, on arrive à cette conviction que le virus symptomatique utilisé dans ses recherches était impur. Duenschmann part, en effet, pour immuniser ses lapins, d'un virus renforcé qui a pour souche le sang d'un cobaye, dans le péritoine duquel il rencontre « les formes longues du microbe, en filaments qui traversent le champ d'observation quelquefois d'un bout à l'autre ». Il s'agit à l'évidence du vibrion septique, car jamais le charbon symptomatique ne donne ces formes longues dans les conditions indiquées; il n'est pas douteux que le sang de ce cobaye, qui a servi à des inoculations successives, contenait à la fois le vibrion septique et le *B. Chauvœi*.

En se servant de cultures pures pour immuniser les cobayes contre le charbon symptomatique, Kitasato a vu au contraire les animaux succomber à la septicémie.

Il faut également remarquer que le lapin, naturellement réfractaire au charbon symptomatique, est réceptif pour la septicémie gangréneuse.

Jamais nous n'avons pu empêcher ou arrêter l'infection symptomatique avec le sérum antigangréneux. Nous signalerons ici que des sérums indifférents, provenant du cheval, neutralisent par mélange le virus du charbon symptomatique. Le sérum antigangréneux que nous préparons prolonge de quelques heures la vie des animaux inoculés avec le charbon symptomatique, sans jamais empêcher leur mort.

Agglutination. — Le sérum antigangréneux agglutine en quelques minutes les cultures jeunes du vibrion septique en bouillon Martin. Au 1/30, la précipitation se fait instantanément en gros flocons, alors qu'un sérum indifférent agglutine au 1/10 en plusieurs heures seulement. A 1/3,000, l'agglutination se fait très rapidement, elle est encore rapide à 1/15,000, et assurée à 1/30,000. Dans le vide, des doses de sérum qui agglutinent très vite à l'air peuvent rester sans effet.

De même le sérum contre le charbon symptomatique agglutine très bien les cultures pures du *B. Chauvœi*.

Nous avons recherché le pouvoir agglutinant du sérum antigangréneux sur nos cultures du *B. Chauvœi*. A 1/30, nous n'avons obtenu l'agglutination totale qu'après plus de 12 heures, tandis qu'au 1/3,000, le sérum anti-symptomatique agglutine en moins de 10 heures.

Le sérum contre le charbon symptomatique n'agglutine qu'au 1/30 au moins, en petits flocons, et après plusieurs heures, les cultures jeunes de vibrion septique: les sérums indifférents se comportent de la même façon. Nous avons dit plus haut que des doses infinitésimales de sérum antigangréneux provoquent instantanément une agglutination très nette. Ces faits nous autorisent à conclure que notre sérum anti-symptomatique n'exerce aucune action agglutinante spécifique sur les cultures du vibrion septique.

En résumé :

1° Il existe entre la bactérie du charbon symptomatique et le vibrion septique des rapports biologiques très étroits.

Il est possible de différencier cependant les deux microbes : le vibrion septique donne, dans la sérosité de l'œdème spécifique et dans le péritoine du cobaye, des formes longues qui font réguliè̀ment défaut avec le charbon symptomatique [1].

2° On peut étendre à l'immunisation contre le vibrion septique toutes les méthodes applicables au charbon symptomatique.

3° Les sérums immunisants contre le charbon symptomatique et la septicémie gangréneuse exercent une action rigoureusement spécifique. L'épreuve de l'agglutination par les mêmes sérums est également spécifique.

4° L'immunisation à l'égard du charbon symptomatique n'implique point la résistance au vibrion septique, et réciproquement les animaux vaccinés contre la septicémie ne le sont pas contre le charbon symptomatique.

1. Le mode de différenciation des deux agents par l'inoculation au lapin n'a qu'une valeur restreinte. Nocard et Roux ont montré que les lapins peuvent succomber au charbon symptomatique; nous avons vu aussi fréquemment le lapin mourir à la suite de l'inoculation de ce virus.

QUELQUES EXPÉRIENCES SUR LA PESTE A PORTO

Par le Dr MÉTIN

MÉDECIN PRINCIPAL DES COLONIES

En dehors des cas de pneumonie pesteuse primitive, que l'on rencontre d'ailleurs assez rarement, on observe fréquemment dans la peste des complications pulmonaires se traduisant à l'auscultation par des signes de broncho-pneumonie. Les crachats des malades renferment dans ces deux cas une abondance plus ou moins grande de bacilles d'Yersin, mis en évidence soit par les préparations directes, soit par les cultures, mais surtout plus facilement par l'inoculation aux animaux. Pendant la période d'état de la broncho-pneumonie pesteuse, les bacilles des crachats sont tout aussi virulents que ceux qu'on retire soit du sang, soit du bubon : ils amènent la mort de la souris en 36-48 heures, et celle du cobaye en 3-4 jours.

La question se pose de savoir pendant combien de temps les bacilles pesteux se retrouvent dans les crachats, et surtout s'ils conservent leur virulence dans ces crachats lorsque le malade est entré en convalescence. On conçoit l'importance de cette question, car si les bacilles pesteux se maintiennent longtemps virulents dans les crachats des convalescents, il est nécessaire de prendre des mesures spéciales contre une source des plus dangereuses de dissémination du bacille.

D'après M. Gotschlich [1], dans les expériences qu'il a faites à Alexandrie, on retrouverait virulents les bacilles pesteux dans les crachats des convalescents de pneumonie pesteuse, non seulement pendant la maladie elle-même, mais encore jusqu'aux 20e, 33e, et 48e jours après la défervescence complète. A Porto, nous avons pu observer huit malades ayant guéri après avoir présenté des symptômes de broncho-pneumonie pesteuse. Deux de ces malades, des infirmières, avaient contracté une pneumonie pesteuse primitive en soignant à l'hôpital des malades atteintes elles-mêmes de peste bubonique avec complications pulmonaires.

1. Gotschlich, *Zeitschrift für Hygiene und Infectionskr.*, XXXII, 3.

Les 6 autres malades avaient eu la peste avec bubons siégeant soit au cou, soit aux aisselles, et les signes de broncho-pneumonie s'étaient présentés vers le 4e jour de la maladie.

Les crachats de ces malades, pendant la période d'état, inoculés à la dose de 1 c. c. dans le péritoine du cobaye, avaient entraîné la mort de l'animal en 3 à 5 jours, et dans les organes de l'animal on retrouvait le coccobacille à l'état de pureté. Nous avons pu suivre ces malades après leur guérison, et injecter leurs crachats à des cobayes, à des intervalles variés, après la défervescence.

Malgré la richesse des crachats en microorganismes variés, nous n'avons pas hésité à employer la voie intrapéritonéale dans toutes nos expériences : lorsque le bacille pesteux était encore virulent, l'animal a succombé à la peste, le microbe d'Yersin se retrouvant pur dans les organes. Dans les cas où, au contraire, le bacille pesteux était absent ou tout au moins avait perdu sa virulence, les autres microbes contenus dans les crachats n'ont eu aucune influence sur la santé de l'animal. En tout cas nous n'avons jamais observé d'autres causes de la mort que celle qui était due à la peste elle-même.

EXPÉRIENCES

1° Balieha de Lima. — Peste bubonique : bubons axillaires et sous-maxillaires. Le 21 novembre, complications pulmonaires : on rencontre de nombreux bacilles pesteux dans les crachats. Un cobaye reçoit le 22 novembre dans le péritoine 1 c. c. de crachats ; il meurt en 4 jours de peste confirmée à l'examen des organes. Le malade entre en convalescence le 30 novembre ; apyrexie à partir de cette date.

Cobaye 1. Le 15 décembre, soit 16 jours après la défervescence, on injecte dans le péritoine d'un cobaye 1 c. c. de crachats.

Les deux jours suivants, l'animal mange peu, mais a gardé toute sa vivacité : il n'y a pas de douleur à la pression de l'abdomen, pas de ganglions, pas de fièvre. A partir du 3e jour, le cobaye a repris tout son appétit, et il se porte très bien à mon départ de Porto, le 20 janvier.

Cobaye 2. Reçoit le 20 décembre, dans le péritoine, 1. c. c. de crachats du même malade, 21 jours après la défervescence.

Le cobaye ne présente rien de particulier, et est laissé en bonne santé.

2° Padua. — Peste avec bubons sous-maxillaires : les crachats renferment des bacilles pesteux le 21 novembre et tuent le cobaye en 3 jours. Apyrexie à partir du 1er décembre.

Cobaye 3. Le 8 décembre, 7 jours après la défervescence, on injecte dans le péritoine d'un cobaye 1 c. c. de crachats de ce malade. Le deuxième jour, apparition d'un ganglion dans les deux aines, perte de l'appétit, douleurs abdominales, fièvre. Le cobaye meurt le 13 décembre ; à l'autopsie, bubons comme des noisettes dans les aines, et comme des lentilles dans le mésentère; la rate est farcie de pseudo-tubercules; tous les organes renferment le bacille d'Yersin.

Cobaye 4. Le 15 décembre, 14 jours après la défervescence, on injecte 1 c. c. de crachats dans le péritoine d'un cobaye : l'animal n'est pas malade, et est laissé en bonne santé le 20 janvier.

Cobaye 5. Même expérience le 9 janvier, soit 40 jours après la défervescence. Le cobaye est bien portant à notre départ.

3° Lobo. — Peste avec complications pulmonaires : le 21 novembre, bacilles dans les crachats, virulents pour le cobaye qu'ils tuent en quatre jours. Apyrexie le 26 novembre.

Cobaye 6. Le 2 décembre, 7 jours après la convalescence, on injecte dans le péritoine d'un cobaye 1 c. c. de crachats de ce malade : l'animal meurt en 6 jours avec tous les symptômes de la peste : le bacille d'Yersin se retrouve gros et allongé dans tous les organes : la rate est farcie de pseudo-tubercules.

Cobaye 7. Même expérience avec des crachats du 11 décembre, soit 17 jours après le retour à l'apyrexie. L'animal continue à se bien porter.

Cobaye 8. Ce cobaye reçoit le 18 décembre 1 c. c. de crachats dans le péritoine, et est laissé en bonne santé.

4° Léop. Gomez. — Peste très grave, non traitée au sérum, bacilles dans les crachats du 1er décembre, tuant le cobaye en 3 jours. Apyrexie le 23 décembre.

Cobaye 9. Reçoit le 30 décembre, soit 7 jours après la convalescence, 1 c. c. de crachats dans le péritoine : il meurt en 5 jours avec les lésions ordinaires de la peste, et le bacille d'Yersin dans tous les organes.

Cobayes 10 et 11. Reçoivent des crachats à la dose de 1 c. c. dans le péritoine : le premier le 6 janvier, le second le 13 janvier, soit 15 et 21 jours après la convalescence. On n'observe rien de particulier.

5° Alb. Cardose. — Peste grave, non traitée au sérum : les crachats renferment des bacilles pesteux le 6 décembre, et tuent le cobaye en 4 jours. Apyrexie le 20 décembre.

Cobaye 12. Inoculé selon le même procédé que les précédents le 28 décembre, soit 8 jours après l'apyrexie, ce cobaye meurt en 7 jours avec toutes les lésions de la peste.

Cobayes 13 et 14. Les 4 et 10 janvier, soit 14 et 20 jours après la convalescence, on injecte 1 c. c. de crachats à 2 cobayes qui continuent à se bien porter.

6° Grac. Maria. — Peste de gravité moyenne, non traitée : bacilles dans les crachats le 11 décembre, tuant le cobaye en 5 jours. Apyrexie le 20 décembre.

Cobaye 15. Meurt en 6 jours après inoculation intrapéritonéale de 1 c. c. de crachats faite le 27 décembre, 7 jours après la défervescence. A l'autopsie on retrouve les lésions pesteuses et le bacille dans tous les organes.

Cobayes 16 et 17. Restent bien portants malgré l'inoculation dans le péritoine de 1 c. c. de crachats les 30 décembre et 10 janvier, c'est-à-dire 10 et 21 jours après le retour à l'apyrexie.

7° Carolina. — Peste pneumonique primitive, non traitée : bacilles dans les crachats le 9 décembre, apyrexie le 19 du même mois.

Cobaye 18. Reçoit dans le péritoine 1 c. c. de crachats le 26 décembre, soit 7 jours après la défervescence. Il meurt le 2 janvier, et le bacille pesteux se retrouve dans tous les organes.

8° Philomèle. — Pneumonie pesteuse primitive : les bacilles pesteux sont constatés dans les crachats le 9 décembre. Apyrexie le 21 décembre.

Cobaye 19. Le 30 décembre, 9 jours après l'apyrexie, on injecte 1 c. c. de crachats dans le péritoine d'un cobaye, qui paraît légèrement malade les 2 premiers jours, avec diminution de l'appétit et de la vivacité, mais sans fièvre ni bubons, et qui se rétablit complètement le 4e jour après l'inoculation. Des prises de sang n'ont donné lieu à aucune culture pendant les deux jours où l'animal paraissait indisposé.

De ces expériences il est permis de conclure que si les bacilles d'Yersin persistent encore virulents dans les crachats des pesteux ayant eu des complications pulmonaires jusqu'au 8e jour après la défervescence, alors que l'auscultation ne révèle plus aucun trouble dans le poumon, leur virulence est néanmoins atténuée dans une certaine mesure, puisqu'ils ne tuent plus le cobaye qu'en 5 à 7 jours, au lieu de 3 à 4. De plus, à partir du 9e jour après le retour à l'apyrexie, l'inoculation de ces crachats dans le péritoine du cobaye ne cause plus la mort de cet animal. On peut donc considérer comme inoffensifs les crachats des malades lorsque 10 jours se sont écoulés à partir de la disparition complète de la fièvre et de tout signe stéthoscopique. Nous devons dire que pendant les 8 ou 9 jours où les crachats ont encore amené la mort du cobaye, nous n'avons jamais pu y voir le bacille pesteux au moyen du microscope et des préparations directes.

La persistance des bacilles d'Yersin et de leur virulence dans les crachats des pesteux pendant les premiers jours de la convalescence est un fait d'une extrême importance au point de vue de la dissémination de la maladie, et en même temps il pourrait être la cause d'une nouvelle réinfection du malade lui-même. Dans le bubon pesteux, le bacille peut également persister un certain temps : dans quelques cas nous avons observé une véritable rechute de la maladie chez des sujets qui avaient été considérés comme guéris. Deux de ces malades sont morts ainsi tardivement d'accidents cérébraux dus au bacille pesteux qui, après avoir sommeillé, pour ainsi dire, sans causer de troubles apparents pendant la convalescence, a repris une vitalité nouvelle. Ce sont des cas de rechute plutôt que de récidive.

Jusqu'à présent, en effet, on ne connaît que fort peu de cas de récidives authentiques de la peste. La raison de la non-récidive dans cette maladie nous a paru intéressante à étudier, et dans ce but nous avons étudié les propriétés du sérum des malades guéris. Nous avons choisi des sujets qui n'avaient pas reçu le traitement par le sérum anti-pesteux. Trois malades ont bien voulu nous autoriser à leur prendre une certaine quantité de sang dans la veine. — Ils avaient été atteints de peste, sans complications pulmonaires, et d'une intensité légère pour l'un d'eux, grave pour les deux autres.

La petite quantité de sérum que nous avons pu nous procurer ne nous a pas permis de faire des expériences absolument complètes. D'autre part, les malades qui avaient bien voulu nous fournir du sang étaient déjà en convalescence à notre arrivée à Porto; nous n'avons pu, par suite, expérimenter les propriétés de leur sérum vis-à-vis du microbe même qui avait été la cause de leur maladie. Néanmoins nous croyons utile de consigner les résultats de nos expériences, si imparfaits qu'ils soient.

1° Jose D... — Peste légère, donne 10 c. c. de sang dont on retire environ 5 c. c. de sérum.

Cobaye 1, reçoit 1 c. c. de sérum sous la peau, et le lendemain on lui injecte, également sous la peau, 1/2 c. c. de culture en bouillon de 24 heures d'un bacille pesteux qui, à la même dose, tue le cobaye témoin en trois jours. — L'animal survit.

Cobaye 2, reçoit sous la peau 1/2 c. c. du bacille pesteux ci-dessus, et le lendemain on lui injecte 1 c. c. de sérum. Ce cobaye est malade pendant environ 5 jours, avec bubons dans les aines, fièvre, perte de l'appétit. Après ce temps il finit par se rétablir complètement.

2° Frederico B... — Peste grave, 10 c. c. de sang; 5 c. c. de sérum.

Cobaye 3. On injecte à ce cobaye, sous la peau, 1 c. c. de ce sérum, et le lendemain, 1/2 c. c. d'une culture en bouillon d'un bacille pesteux tuant le cobaye témoin en 3 jours et demi.

Ce cobaye paraît malade les 2 premiers jours : néanmoins on ne sent pas de bubons, et l'animal n'a pas de fièvre; il se rétablit.

Cobaye 4. — 24 heures après avoir injecté 1/2 c. c. de culture en bouillon du même bacille pesteux que pour le précédent, on injecte 1 c. c. de sérum Fred. B. Le cobaye meurt en 10 jours : œdème considérable au point d'inoculation. Bubons dans les aines. La rate est volumineuse. Tous les organes renferment le bacille pesteux, gros et allongé. Quelques bacilles sont allongés, et on trouve des granulations dans beaucoup de globules blancs.

3° Antonio C... — Peste grave, 15 c. c. de sang donnent 6 c. c. de sérum.

Cobayes 5 et 6. Les mêmes expériences au point de vue de propriétés préventives et curatives de ce sérum sont faites sur ces deux cobayes. Alors que le témoin meurt en 3 jours, ces deux cobayes survivent.

Nous avons refait, à l'Institut Pasteur, avec le concours amical de M. Dujardin-Beaumetz, une autre série d'expériences en nous servant de la souris, animal plus sensible à la peste que le cobaye. Les microbes qui nous ont servi dans ces expériences étaient le bacille dit de Djeddah, dont la piqûre tuait la souris témoin en 60 heures, et le bacille de la Réunion qui amenait la mort du témoin en 48 heures.

I. Sérum José D... — *Souris* 1. Reçoit 1/2 c. c. de ce sérum sous la peau du dos et, le lendemain, une piqûre de b. de Djeddah. La souris meurt en 7 jours : survie 4 jours 1/2.

Souris 2. On injecte 1 c. c. de ce sérum 24 heures avant une piqûre de b. de la Réunion : elle meurt avec une survie de 3 jours 1/2.

Souris 3. On pique cette souris avec le bacille de Djeddah, et le lendemain on lui injecte 1/4 de c. c. sérum José D. La souris meurt en 8 jours, avec une survie de 5 jours et demi.

Souris 4. — Reçoit une piqûre de Djeddah, et le lendemain une injection de 1/10 de c. c. de sérum José D. Elle meurt avec une survie de 42 heures.

II. Sérum Antonio C... — *Souris* 5. Une dose de 1/2 c. c. de ce sérum, injectée 24 heures avant une piqûre de Djeddah, retarde la mort de cette souris de 4 jours 1/2.

Souris 6. Reçoit 1 c. c. de sérum Antonio C. sous la peau ; 24 heures après, on la pique avec le bacille de la Réunion. Elle meurt 15 jours après la piqûre, soit une survie de 13 jours.

Souris 7. 1/10 de c. c. de ce sérum ne retarde la mort que de 42 heures chez cette souris qui a été piquée avec une culture de Djeddah.

III. Sérum Frederico B... — *Souris* 8. Reçoit 1/2 c. c. de ce sérum dans le dos. 24 heures après, on la pique avec une culture de Djeddah. Elle meurt en 90 heures : survie 30 heures.

Souris 9. On injecte à cette souris 1 c. c. de sérum Frederico, et le lendemain on la pique avec une culture de la Réunion ; la survie est de 3 jours 1/2.

Ces expériences montrent que le sérum des malades guéris

naturellement de la peste, sans avoir reçu le traitement par le sérum antipesteux, jouit de propriétés légèrement préventives et même curatives. Chez le cobaye, nous avons, sauf dans un seul cas, toujours observé la survie des animaux en expérience, que le sérum ait été employé à titre préventif ou à titre curatif. S'il n'en a pas été de même pour la souris, cela peut tenir à deux causes : la plus grande sensibilité de cet animal vis-à-vis du coccobacille d'Yersin, ou bien la longue durée pendant laquelle nous avions conservé le sérum avant de renouveler nos expériences. Bien que le sérum ait été maintenu dans des tubes scellés à la lampe, il est possible que les trois mois qui se sont passés entre la prise du sang et l'expérimentation du sérum aient atténué les propriétés qu'il a montrées dans nos expériences chez le cobaye.

Contribution à la nutrition intracellulaire des levures

Par E. KAYSER

(Travail du laboratoire des fermentations à l'Institut agronomique.)

Les boissons fermentées subissent en vieillissant des variations d'acidité d'origines diverses. Il y en a de chimiques : précipitation de la crème de tartre dans les vins, phénomènes d'éthérification ; d'autres sont d'origine microbienne et sont dues à diverses espèces de bactéries et de mycodermes.

Y en a-t-il qui doivent être mises au compte de la levure ? c'est ce dont on a longtemps douté et ce qui a été mis en lumière par les travaux de divers savants.

Pasteur, cultivant de la levure dans un milieu nutritif additionné d'acide racémique, a montré qu'elle faisait d'abord disparaître l'acide droit en laissant l'acide gauche intact.

Naegeli nous a appris que la levure était apte à prendre le carbone, nécessaire à la constitution de ses tissus, à beaucoup d'hydrates de carbone, à divers acides organiques, et il a vu que la présence de l'oxygène favorisait beaucoup cette assimilation.

Boussingault, Gœthe et Kulisch ont constaté des diminutions notables et progressives d'acidité dans les cidres ; ce dernier savant cite même un cas où la diminution de l'acidité d'un cidre a atteint 40 0/0 de l'acidité primitive.

Des faits analogues ont été trouvés avec les vins par A. Czeh, Muller-Thurgau et Kulisch.

Kulisch, le premier, attribue cette diminution d'acidité à la levure et il y voit un phénomène d'ordre vital. Ayant constaté des diminutions d'acidité très sensibles dans les bouteilles de vin complètement remplies et maintenues à l'abri de l'air, il élimine la levure par filtration, ou la détruit par chauffage, et il voit la diminution de l'acidité s'arrêter complètement.

Wortmann nous a montré que la disparition des divers acides dépendait de l'espèce de levure employée, et qu'en général l'acide malique était le plus facilement détruit.

Il est très probable que beaucoup de facteurs interviennent ici : c'est ce qui résulte d'une étude de M. Schukow.

Ce savant, opérant avec des milieux naturels (jus de raisins) ou artificiels, additionnés de divers acides, a fait voir que diverses levures pouvaient faire disparaître ces acides en quantités variables; c'est ainsi que l'acide citrique disparaissait plus facilement que l'acide succinique ; il est probable que chaque levure a ses préférences.

Schukow a, en outre, constaté que la diminution était, en général, plus forte dans les milieux nutritifs aérés et riches en azote.

De toutes ces recherches, il résulte donc que le ferment alcoolique intervient dans la disparition de l'acidité des boissons fermentées, et il y a à se demander quand et comment il exerce cette action.

La question ne présente pas un intérêt pratique bien considérable, car les boissons fermentées sont, en général, séparées aussitôt de leurs lies. De plus ces actions de combustion exigent le contact de l'oxygène de l'air, qui entre très difficilement dans les vases vinaires et disparaît très vite du liquide, comme l'a montré Pasteur, employé qu'il est à des oxydations d'ordre chimique. Néanmoins, la question présente un certain intérêt, et j'ai été d'autant plus encouragé à l'aborder que jusqu'à présent personne n'a étudié séparément les variations de l'acidité fixe et celles de l'acidité volatile.

En faisant ce départ, on peut espérer voir un peu ce qui se passe dans la nutrition intra-cellulaire de la levure.

Dans ce travail, les acidités totales, titrées à l'eau de chaux, sont exprimées en grammes et en milligrammes par litre ; elles ont été calculées en équivalents de l'acide employé dans l'expérience. Les acides volatils, dosés d'après la méthode des distillations fractionnées de M. Duclaux, sont exprimés en acide acétique et en milligrammes par litre.

Lorsqu'on avait affaire à l'acide succinique comme seul acide fixe, soit qu'il ait été ajouté au liquide soumis à la fermentation, soit qu'il fût produit par fermentation, les nombres obtenus sont faciles à interpréter. Si l'on a d'autres acides fixes mélangés à l'acide succinique, on peut appliquer la méthode de M. Laborde.

Elle consiste à évaporer à siccité au bain-marie le liquide

fermenté en présence de sable, et à traiter ensuite l'extrait desséché, additionné de grenailles de plomb, par l'éther à froid ou encore à chaud par un appareil à épuisement.

M. Laborde nous a montré qu'il pouvait y avoir une éthérification quelquefois forte pendant l'évaporation, grâce à la présence de la glycérine : aussi les nombres trouvés pour l'acide succinique par l'extraction à l'éther sont souvent notablement inférieurs à ceux calculés par différence entre l'acidité totale et volatile : mais on peut retrouver, par une saponification, l'acide succinique qui disparaît à l'état d'éther.

On peut encore empêcher cette éthérification en procédant comme suit : on évapore à siccité complète le liquide fermenté, neutralisé préalablement à l'eau de chaux titrée ; on met les acides en liberté en faisant bouillir avec une quantité d'acide oxalique correspondant à l'eau de chaux employée, on filtre et on applique la méthode de M. Laborde.

En dehors de ces éthers formés pendant l'évaporation du liquide, il s'en produit d'autres pendant toute la durée de la fermentation par suite des réactions qui ont lieu entre l'alcool, la glycérine, les acides préexistants ou produits, et leur quantité peut varier énormément, non seulement avec le temps, mais encore avec la levure en présence. En effet, les diverses levures placées dans les mêmes conditions de culture se multiplient plus ou moins, donnent des quantités variables d'alcool, de glycérine, d'acides, brûlent ces derniers plus ou moins vite, et dès lors peuvent réagir indirectement sur les phénomènes d'éthérification. Il était donc nécessaire de tenir compte de ces éthers formés, afin de ne pas compter comme acides disparus ceux qui auraient passé à l'état d'éthers, et pour éviter ainsi des erreurs d'interprétation qui pourraient résulter de la méconnaissance de ces variations. Ainsi j'ai trouvé une levure, isolée d'une lie de Château-Latour, qui donne beaucoup d'éther acétique, et qui, après avoir rendu le milieu acide, le rend ensuite alcalin dans des conditions spéciales sur lesquelles nous reviendrons dans un autre travail. Il y a toujours de l'acide acétique, mais il est à l'état d'acétate d'ammoniaque ; cette formation peut ainsi expliquer la disparition des acides, sans combustion directe par la levure.

Pour doser ces éthers, on a opéré comme suit : on évapore un certain volume de liquide en présence d'un excès de solution

potassique de volume et de titre connus, au bain-marie à sec ; on retire l'excès de potasse par l'acide sulfurique, titré à nouveau par de la potasse décime. Les éthers ainsi obtenus sont calculés en acide succinique. Si nous soumettons ensuite le liquide à la distillation, après mise en liberté des acides par l'addition d'un excès d'acide tartrique ou d'acide sulfurique, on obtient les acides volatils libres et ceux qui étaient combinés à l'état d'éthers ; comme on peut faire le dosage des acides libres à part, on a par différence les éthers volatils exprimés en acide acétique ; il ne reste plus qu'à retrancher ces éthers volatils des éthers totaux pour avoir les éthers fixes. Je m'attacherai surtout à indiquer les résultats des expériences faites avec un seul acide fixe, le plus intéressant au point de vue qui nous occupe, l'acide succinique.

Dans un certain nombre d'expériences, nous montrerons par des courbes les variations des acides totaux, acides fixes, acides volatils, ainsi que celles de la somme des acides et des éthers correspondants dans un même ballon depuis le commencement jusqu'à la fin de l'expérience.

Ceci posé, indiquons brièvement le mode opératoire employé : la première analyse, correspondant à la fin de la fermentation, sert de point de départ, c'est-à-dire que toutes les variations constatées pendant la durée d'une expérience sont rapportées à celle-ci ; ces variations sont quelquefois calculées en proportions centésimales et précédées des signes + ou —, selon qu'il s'agit d'une augmentation ou d'une diminution de l'acidité considérée.

Pour le prélèvement des échantillons, le mieux est de faire des prises successives dans un même ballon, en tenant compte de l'évaporation pendant le temps qui s'est écoulé entre les dates des diverses prises, et à rapporter ensuite tous les nombres à la concentration de la première analyse, c'est ce que j'ai fait dans une partie des expériences.

On peut également ensemencer un certain nombre de matras de même dimension à l'aide de la même boucle de platine trempé dans une même culture, et à chaque analyse sacrifier un ou plusieurs matras. Certes on n'a pas le droit d'identifier tous ces matras, car les acidités totales et volatiles ne sont pas tout à fait les mêmes dans les différents matras ni au départ ni à la fin ; je dois cependant ajouter que

dans nombre d'expériences, j'ai trouvé une identité presque absolue aussi bien au début qu'à la fin, et dès lors je crois que ce mode opératoire nous permet de nous faire une idée suffisante des variations d'acidité qui se produisent dans le courant d'une fermentation.

Les variations de l'acide succinique, produit normal de la fermentation alcoolique, étant les plus intéressantes à étudier, c'est avec lui que nous avons fait le plus d'essais.

En étudiant maintenant les variations constatées dans l'acidité totale, fixe et volatile, nous pouvons nous rendre facilement compte s'il y a augmentation ou diminution, et quel est le sens du phénomène.

Nous allons d'abord suivre ces variations dans un même ballon, mais dans des liquides différents additionnés de quantités variables d'acide succinique, ou laissés sans addition d'aucun acide, et avec ce cas n'ayant que les acides produits par la fermentation : acide succinique et acide acétique.

1re Expérience. — Ensemençons de l'eau de touraillons à 10 0/0 de saccharose, additionnée ou non d'acide succinique, avec une même levure de vin et faisons des prises dans ces deux ballons après 24, 78, 119 jours.

	Ballon sans addition d'acide succinique.	Ballon additionné d'ac. succinique.
Acidité totale à la fin de la 1re fermentation.	1,245	3,931
Diminution après 24 jours....	0,193	0,202
— — 78 —	0,334	1,063
— — 119 —	0,210	1,611
Acidité fixe à la fin de la 1re fermentation ..	1,130	3,583
Diminution après 24 jours..................	0,135	0,161
— — 78 —	0,254	0,780
— — 119 —	0,155	1,314
Acidité volatile à la fin de la 1re fermentation.	0,115	0,351
Diminution après 24 jours.................	0,068	0,041
— — 78 —	0,080	0,283
— — 119 —	0,055	0,297
Variation centésimale de l'acidité fixe......	13,71	36,67
— — — volatile..	47,82	84,61

Nous constatons dans les deux ballons une diminution progressive des trois acidités : cette diminution est bien plus forte dans le ballon qui a reçu de l'acide succinique à l'origine ; il semble même se former des acides fixes et des acides volatils dans le ballon non additionné d'acide succinique, à la fin de l'expérience.

2e Expérience. — Ensemençons maintenant deux autres ballons contenant de l'eau de levure à 10 0/0 de saccharose avec une levure de vin. L'un A reste sans acide, l'autre D est additionné d'acide succinique à l'origine ; le

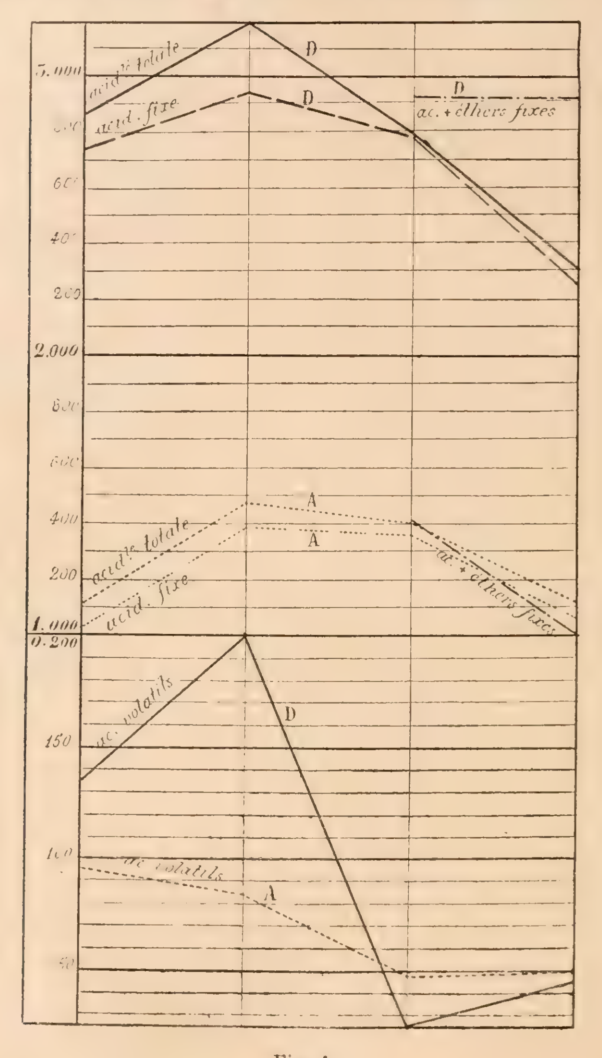


Fig. 1.

tableau suivant et les courbes de la figure 1 nous renseignent sur les variations des divers acides ; on y trouve egalement pour la fin de l'expérience la somme des acides fixes et éthers fixes ; la figure 2 représente les courbes des variations d'acidité dans deux autres ballons B et F, le premier additionné à la 2e prise d'acide acétique, le second F d'acide succinique.

	Ballon A.	Ballon B.
Acidité totale à la fin de la 1re fermentation.	1,130	2,860
Variation après 46 jours..................	+ 0,340	+ 0,340
— — 95 —	+ 0,278	— 0,065
— — 109 —	— 0,115	»
— — 150 —	»	— 0,555

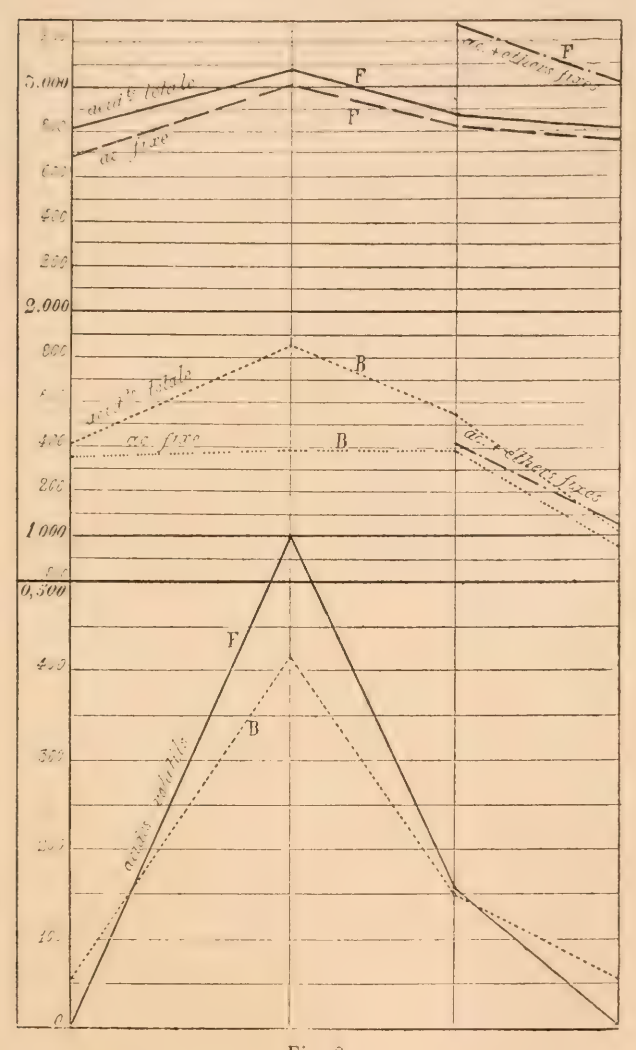


Fig. 2.

Acidité fixe à la fin de la 1re fermentation..	1,034	2,722
Variation après 46 jours..................	+ 0,353	+ 0,272
— — 95 —	+ 0,326	+ 0,046
— — 109 —	— 0,069	»
— — 150 —	»	— 0,161

Acidité volatile à la fin de la 1re fermentation.	0,096	0,138
Variation après 46 jours.....................	— 0,013	+ 0,068
— — 93 —	— 0,048	— 0,111
— — 109 —	— 0,046	»
— — 150 —	»	— 0,094
Variation centésimale de l'acidité fixe.........	6,67	16,93
— — — volatile...	47,91	68,41

Les variations centésimales de l'acidité volatile ressemblent à celles trouvées avec l'eau de touraillons : par contre les variations centésimales de l'acidité fixe sont bien plus faibles pour une durée moyenne de 120 jours. Ceci nous montre l'influence du milieu, la levure ensemencée étant la même pour les deux expériences ; la somme des acides fixes et des éthers fixes va en diminuant entre la 3e et la 4e prise dans les quatre ballons.

Ces deux expériences nous montrent que l'acidité fixe et volatile diminuent en présence de la levure, dans des proportions variables avec le milieu de culture et les conditions de l'expérience.

Passons maintenant en revue toutes les influences extérieures qui modifient la nutrition de la levure. Nous allons retrouver de nombreuses variations qui rappellent celles qu'on trouve pour le pouvoir ferment d'une levure.

A) *Influence de la race de levure.* — Toutes les levures ne se ressemblent pas. Elles ne transforment pas toutes avec la même facilité une même quantité de sucre en alcool et en acide carbonique ; elles ne produisent pas, toutes choses égales d'ailleurs, les mêmes proportions de glycérine, d'acide succinique, d'acides volatils, et nous allons voir qu'elles ne font pas disparaître avec la même vitesse les acides qu'elles trouvent dans les liquides. Citons à cet effet quelques expériences.

1re Expérience. — Deux levures de vin, 6 et B, ont été ensemencées dans l'eau de touraillons, sucrée à 4 0/0 et additionnée de 6 grammes d'acide tartrique par litre ; voici les variations constatées pour les acidités.

	Levure 6.	Levure B.
Acidité totale à la fin de la fermentation..	7,49	8,76
Variation après 7 semaines...............	— 0,49	— 1,59
Acidité fixe à la fin de la fermentation ...	6,69	8,04
Variation après 7 semaines...............	— 0,15	— 1,14
Acidité volatile à la fin de la fermentation.	0,64	0,58
Variation après 7 semaines...............	— 0,27	— 0,36
Diminution centésimale de l'acidité fixe...	2,2 0/0	14,2 0/0
— — — volatile.	43 0/0	62 0/0

La levure B fait donc disparaître beaucoup plus d'acidité que la levure 6 : la différence est surtout sensible avec les acides fixes ; ces variations ne peuvent, en effet, pas s'expliquer par des proportions variables d'éthers formés, à moins d'admettre *a priori* des productions de glycérine variant dans le rapport de 1 à 3 pour les deux levures 6 et B.

2e Expérience. — Du jus de raisin a été ensemencé avec diverses levures et analysé après 15 jours, 3 mois et 5 mois.

	Levure 1	Levure 7	Levure 16	Levure 35
Acidité totale à la fin de la fermentation	6,36	5,54	5,63	6,24
Variation après 90 jours	— 0,13	— 0,58	— 0,84	— 1,08
— — 150 —	— 1,24	— 1,17	— 0,15	— 0,87
Acidité fixe à la fin de la fermentation	6,19	5,14	5,37	5,88
Variation après 90 jours	— 0,02	— 0,27	— 1,05	— 0,84
— — 150 —	— 1,11	— 0,83	— 0,16	— 0,57
Acidité volatile à la fin de la fermentation	0,14	0,32	0,22	0,29
Variation après 90 jours	— 0,09	— 0,25	+ 0,16	— 0,19
— — 150 —	— 0,11	— 0,27	— 0,01	— 0,25
Diminution centésimale finale de l'acidité fixe	17,8	16,1	2,8	9,7
Diminution centésimale finale de l'acidité volatile	82	85	1	83

Nous constatons une diminution progressive et sensiblement pareille de l'acidité fixe et volatile pour les deux levures 1 et 7 ; par contre l'acidité passe par des oscillations plus ou moins fortes pour les deux autres levures. Faut-il y voir un caractère physiologique, ou peut-on attribuer cette grande différence à des phénomènes d'éthérification ? Contentons-nous pour le moment de la signaler et de dire que la levure 6 montre, en général, des diminutions suivies d'augmentation d'acidité, c'est-à-dire que les ballons ensemencés avec cette levure passent par des oscillations souvent très fortes dans la dose des divers acides fixes et volatils.

3e Expérience. — Du moût de raisin, avec 8gr,51 d'acidité par litre, est ensemencé avec les deux levures de vin 1 et 16 ; aussitôt que la 1re fermentation est terminée, on fait une première prise et on abandonne les matras à la température de 25° de l'étuve ; la 2e prise a été faite après 90 jours et la 3e prise après 110 jours.

	Levure 1.	Levure 16.
Acidité totale à la fin de la fermentation.....	10,42	9,29
Variation après 90 jours	— 1,73	— 1,02
— 110 jours....................	— 2,22	— 1,45
Acidité fixe à la fin de la fermentation.......	10,11	8,82
Variation après 90 jours	— 1,54	— 0,65
— 110 jours	— 1,97	— 1,05
Acidité volatile à la fin de la fermentation....	0,25	0,38
Variation après 90 jours	— 0,16	— 0,30
— 110 jours....................	— 0,20	— 0,32
Diminution centésimale finale de l'acidité fixe.	19,5	11,9
Diminution centésimale finale de l'acidité volatile	80,0	84,4
Poids moyen de levure	3,98	4,49
Un gramme de levure a fait dsparaître. { Acide fixe ...	0,50	0,23
{ Acide volatil.	0,50	0,78

Nous constatons une diminution centésimale d'acidité fixe plus forte avec la levure 1; la diminution de l'acidité volatile est sensiblement la même pour les deux levures, mais si nous nous rapportons à l'unité de levure, nous voyons que la levure 1 détruit autant d'acidité fixe que d'acidité volatile par gramme; pour la levure 16 la différence est du simple au triple.

Si l'on calcule la diminution journalière, on s'aperçoit que la levure 1 se comporte à peu près de la même manière pendant toute la durée de l'expérience : dans la 1re période elle fait disparaître 17 milligrammes d'acide fixe et 17 milligrammes d'acide volatil par jour; pendant la 2e période environ 20 de chacun des deux acides; la levure 16 par contre détruit 7 et 20 milligrammes d'acide fixe pendant les deux périodes, et 33 et 20 d'acide volatil, c'est-à-dire qu'au commencement la levure 16 semble s'attaquer surtout à l'acidité volatile et à la fin à l'acidité fixe.

La levure employée semble donc influer sur la disparition des acides et faire varier les acides fixes et volatils dans des proportions différentes.

II

Les levures ont des milieux de culture qu'elles préfèrent, variables d'une espèce à l'autre, et parmi les facteurs qui influent ici, il importe de citer l'acidité du milieu et la nature de l'acide fixe ou volatil présent. Étudions donc au point de vue de cette acidité l'influence du milieu.

Influence de l'acidité du milieu : A) acides fixes. — Lorsqu'on ensemence diverses levures de vin dans des moûts de raisin

d'acidité variable, on trouve que les liquides fermentés contiennent des acidités variables avec le moût primitif et avec la levure employée ; le rang occupé par chaque levure varie d'un moût à l'autre. Considérons les résultats constatés avec différents milieux au point de vue de la dose et la nature de l'acide.

1re Expérience. — Lorsqu'on ensemence avec une même levure de l'eau de touraillons ou de l'eau de levure sucrée et additionnée de quantités à peu près équivalentes d'acide tartrique, ou d'acide malique, ou d'acide citrique, et qu'on abandonne les liquides fermentés en présence de la levure, on voit que les acidités totales et volatiles diminuent régulièrement ; nous laissons de côté les acidités fixes, en raison des incertitudes qui affectent le dosage lorsque plusieurs acides fixes se trouvent en présence ; le ballon A a reçu de l'acide tartrique, le ballon B de l'acide malique et le ballon C de l'acide citrique.

	A	B	C
Acidité totale à la fin de la 1re fermentation	6,290	4,980	5,890
Diminution après 93 jours	— 0,820	— 0,780	— 0,490
Acidité volatile à la fin de la 1re fermentation	0,275	0,164	0,206
Diminution après 93 jours	— 0,226	— 0,143	— 0,185
Variation centésimale de l'acidité totale	— 13 0/0	— 15 0/0	— 8,3 0/0
Variation centésimale de l'acidité volatile	— 82,2	— 87,2	— 89,8

La disparition des acides totaux est la plus forte dans le ballon B, soit parce que là il y a plus d'acide succinique, soit encore parce que l'acide malique est plus facilement brûlé que les deux autres acides.

Il est fort probable qu'il existe pour chaque acide une dose optima pour laquelle la diminution de l'acidité atteint, avec une levure donnée, un maximum.

Voyons maintenant comment une même levure se comporte dans le même milieu avec diverses doses d'un même acide.

2e Expérience. — On ensemence de l'eau de touraillons à 3 0/0 de saccharose, additionnée d'un demi-équivalent ou d'un équivalent et demi d'acide tartrique par litre environ, avec une levure de vin. On fait une première analyse et on abandonne les ballons pendant 13 semaines à l'étuve.

	Dose 1/2 AT.	1 1/2 AT.
Acidité totale à la fin de la 1re fermentation	4,48	13,16
Diminution après 90 jours	— 0,20	— 0,31
Acidité volatile à la fin de la 1re fermentation	0,61	0,80
Diminution après 90 jours	— 0,60	— 0,39
Variation centésimale de l'acidité totale	— 4,4	— 2,3
Variation centésimale de l'acidité volatile	— 98,6	— 48,8

Cette expérience nous apprend que les diminutions absolues et centésimales des acides fixes et volatils sont plus élevées avec la dose faible d'acide tartrique à l'origine; dans une autre expérience, l'acide citrique s'est comporté comme l'acide tartrique.

Prenons enfin un milieu plus complexe, le jus de raisins, et voyons ce qui s'y produit :

3e Expérience. — Deux jus de raisin A et B, ayant à l'origine une acidité totale de 12gr,54 et de 8gr,5 par litre exprimées en acide tartrique, sont ensemencés avec la levure de vin 1 ; après la première analyse, les ballons sont abandonnés pendant 110 jours à la température de 25°.

	A	B
Acidité totale à la fin de la 1re fermentation...	12,62	10,42
Variation après 110 jours....................	— 1,65	— 2,22
Acidité fixe à la fin de la 1re fermentation.....	12,26	10,11
Variation après 110 jours....................	— 1,27	— 1,97
Acidité volatile.............................	0,29	0,25
Variation après 110 jours....................	— 0,23	— 0,20
Variation centésimale de l'acidité fixe.........	10,3	19,5
Variation centésimale de l'acidité volatile.....	77,4	80,0

C'est donc encore dans le moût le moins acide que l'acidité a diminué le plus; mais le jus de raisin est un milieu fort complexe ; il renferme, à côté de l'acide tartrique, d'autres acides fixes, en plus ou moins grande proportion : je n'ai pas recherché si c'était l'acide tartrique ou l'acide succinique qui avait surtout disparu, soit comme acide ou comme éther.

B) *Acides volatils. Acide acétique.* — Le plus important parmi les acides volatils est l'acide acétique, produit constant de toute fermentation alcoolique : nous savons qu'il disparaît plus rapidement que les acides fixes et dans des proportions d'autant plus fortes que les doses en sont plus élevées.

1re Expérience. — Ensemençons avec une levure de vin deux ballons contenant de l'eau de levure sucrée et additionnée d'acide succinique; lorsque la première fermentation est terminée, ajoutons de l'acide acétique dans le ballon B; voici comment se sont comportés ces deux ballons, lors des différentes prises.

	A	B
Acidité totale au début.....................	6,220	6,590
Diminution après 93 jours..................	— 1,080	— 1,430
Acidité fixe au début.......................	6,026	5,743
Diminution après 93 jours..................	— 0,918	— 0,713
Acidité volatile au début..................	0,194	0,847
Diminution après 93 jours..................	— 0,162	— 0,718
Variation centésimale de l'acidité fixe......	15,23	12,41
Variation centésimale de l'acidité volatile ..	83,50	84,65

L'addition d'acide acétique semble retarder la disparition des acides fixes, tandis que l'acidité volatile disparaît à peu près dans la même proportion. mais le milieu de culture et la levure interviennent encore ici, comme le montre l'expérience suivante :

2e Expérience. — Les ballons A avaient à l'origine une acidité volatile de 90 milligrammes, les ballons B de 1090, c'est-à-dire 1 gr. de plus; l'expérience a également duré 90 jours.

	Ballons A.			Ballons B.		
	Lev. e.	16	71	e.	16	71
Diminution centésimale de l'acidité fixe............	68,3	25,2	34,9	42,1	25,2	27,7
Diminution centésimale de l'acidité volatile.........	41	27	62	93,4	92,2	97,7

On pouvait se demander quelle était l'influence des produits formés pendant la fermentation, parmi lesquels l'acide acétique et les éthers ont un rôle spécial; pour le voir, il fallait donc les éliminer, enlever tout le liquide d'une fermentation. laisser la levure et y verser une quantité égale de liquide nutritif non fermenté, non sucré. mais additionné d'une quantité d'acides fixes et volatils égale à celle qui a été enlevée. En comparant des ballons pareils, l'un dans lequel on a fait une première prise. l'autre qui a reçu du liquide neuf. on trouve dans ce dernier une légère augmentation de l'acidité fixe suivie ensuite d'une diminution de cette acidité; l'acidité volatile diminue constamment dans les deux ballons, la diminution centésimale approche de 90 à 95 0/0.

Si la proportion de levure jeune est forte, la disparition des acides peut être complète, comme nous le montre l'expérience suivante.

On siphonne le liquide d'une fermentation alcoolique (400 c. c.) aussitôt que la première fermentation est finie, et on remplace par 150 c. c. d'eau de touraillons acidulée en acide succinique et acide acétique; le ballon A reçoit de plus 3 c. c. d'alcool à 95°; on abandonne à l'étuve pendant 60 jours.

L'observation journalière nous a montré que la levure mène une vie aérobie et forme voile à la surface.

	A l'origine.		Après 60 jours.	
	A	B	A	B
Acidité totale..........	1,337	1,437	0,085	0,122
— volatile........	0,442	0,442	0,010	0,008
— fixe............	0,896	0,995	0,076	0,039

Les acides avaient donc presque complètement disparu; car il n'y avait que 20 milligrammes d'éthers totaux dans le ballon A et 60 dans le ballon B.

Il pouvait être utile de voir comment se comporteraient les divers acides volatils, les plus communément trouvés dans les liquides fermentés : acide formique, acide propionique et acide butyrique.

Dans ce but, j'ai ajouté aux liquides fermentés, laissés en présence de la levure, des quantités déterminées de ces divers acides, que l'on a dosés par la méthode des distillations fractionnées de M. Duclaux.

Acide formique. — Cet acide, qui se forme dans beaucoup de circonstances, n'apparaît, en général, que très rarement dans les liquides de culture on peut se demander s'il est toujours absent, et si la levure ne peut en former dans certaines conditions.

M. Khoudabachian a trouvé de l'acide formique dans les raisins secs et de très faibles traces dans les moûts naturels.

Des essais faits avec diverses levures et dans divers milieux de culture, aux températures de 10°, 25° et 35°, m'ont montré la formation d'acide formique, en proportion variable avec la température et avec la levure employée; nous savons, aussi, par les expériences de M. Duclaux, que les levures peuvent brûler cet acide, si la dose ne dépasse pas 0 gr. 4 par litre; dès lors on n'a qu'à ajouter une solution d'acide formique dans le liquide fermenté et voir ce qu'il devient.

Je me contenterai de montrer les résultats fournis avec la levure de vin 9.

Acidité volatile au départ.	A. Acétique	0,758
	A. Formique	0,317
Variations après 60 jours.	A. Acétique	0,870
	A. Formique	0,230
Variations après 135 jours.	A. Acétique	0,644
	A. Formique	0,053
Variation centésimale après 135 jours.	A. Acétique	27,4
	A. Formique	83,0

L'acide formique disparaît donc avant l'acide acétique, et il disparaît beaucoup plus rapidement à l'étuve (25°) qu'à la température de 10°.

Acide propionique et acide butyrique. — Il existe des levures qui brûlent l'acide propionique en notables proportions ; d'autres le laissent intact.

De plus on remarque qu'avec telle levure, la présence de cet

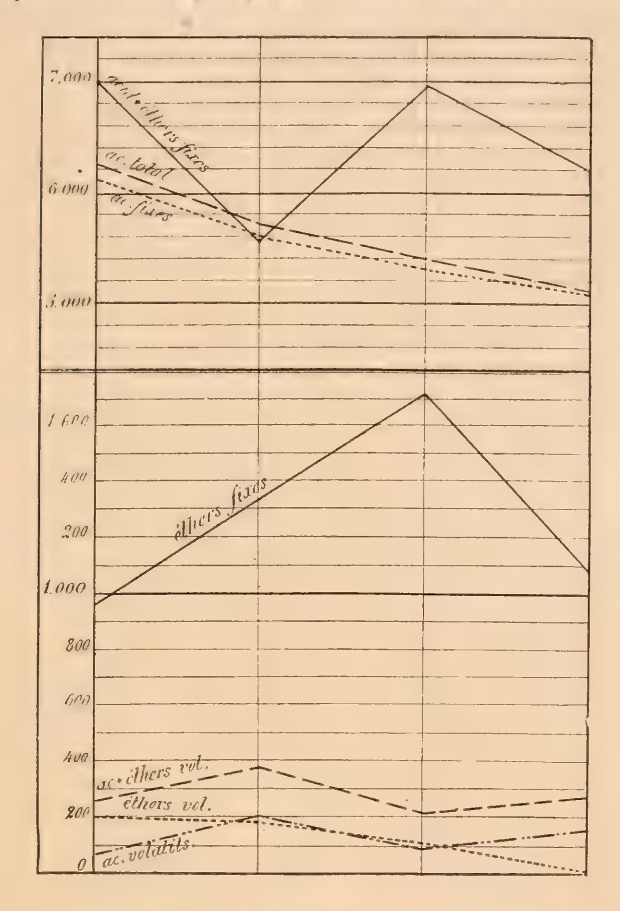


Fig. 3.

acide favorise la disparition de l'acide succinique, pour telle autre la disparition de l'acide acétique.

La levure n'attaque que faiblement l'acide butyrique : en sa présence l'acide acétique disparaît vite. On peut se demander si l'addition d'acide butyrique à un liquide ne change pas le mode de vie des levures; leur vitalité ne diminue pas en présence de 0 gr. 2 d'acide butyrique par litre : il convient, en

outre, de signaler qu'avec l'acide butyrique on trouvait, à la dernière prise de la distillation, de notables quantités d'acide valérianique, bien supérieures à celles trouvées dans l'acide butyrique employé.

En résumé, nous avons vu que les acides peuvent disparaître

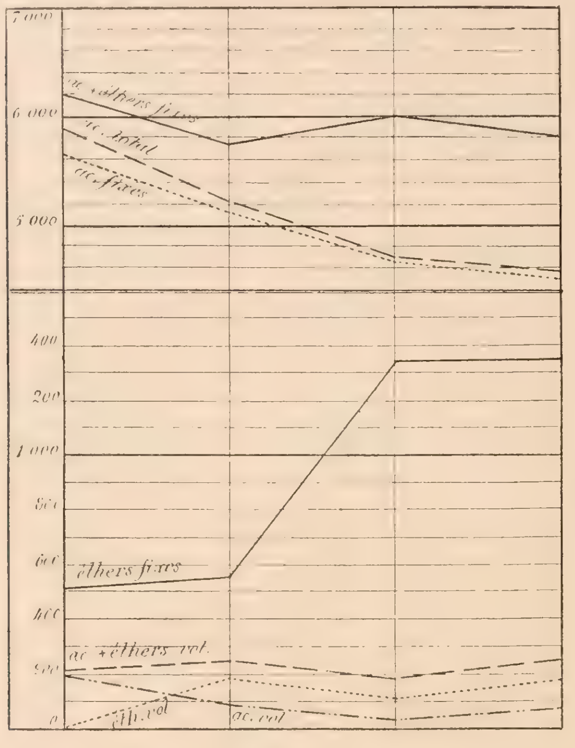


Fig. 4.

en proportions plus ou moins fortes selon le milieu considéré; une partie est brûlée, une autre passe à l'état d'éthers.

D. Influence de la matière azotée. — L'addition de peptone à un milieu de culture favorise, en général, le développement de la levure, et dès lors on peut à prévoir une disparition plus rapide des acides fixes et volatils; voyons si l'expérience confirme ces prévisions.

1re Expérience. — Ensemençons de l'eau de levure à 10 0/0 de saccharose, acidulée à l'acide succinique (ballon A), et additionnée, en outre, de 0,5 0/0 de peptone (ballon P); faisons des prises à différents moments dans les deux

ballons, et étudions ainsi la disparition des acides fixes et volatils. Représentons de même par des courbes les variations constatées pour le ballon A fig. 3, ballon P fig. 4; enfin, donnons aussi le graphique d'un autre

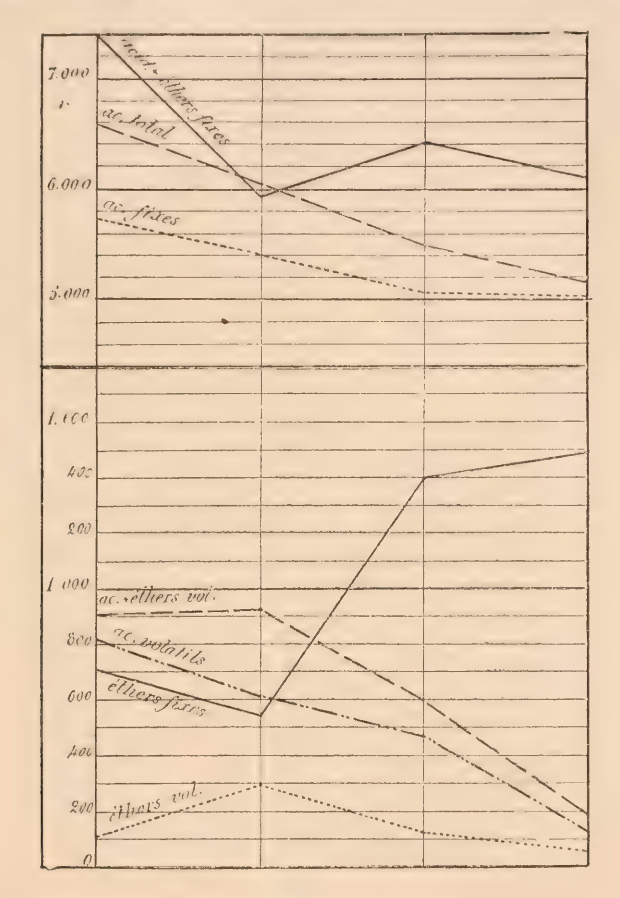


Fig. 5.

ballon B (fig. 5), semblable aux ballons A et P, mais ayant reçu, peu après la première prise, une dose d'acide acétique. On voit que les courbes d'un même élément ont la même allure générale dans les trois ballons; nous parlerons plus loin des éthers formés.

	A	P
Acidité totale à la fin de la 1re fermentation....	6,220	5,890
Diminution après 27 jours....................	0,510	0,650
— 53 jours....................	0,790	1,190
— 93 jours....................	1,080	1,320
Acidité fixe à la fin de la 1re fermentation.....	6,026	5,688
Diminution après 27 jours....................	0,504	0,524

Diminution après 53 jours	0,705	1,024
— 93 jours	0,918	1,187
Acidité volatile à la fin de la 1re fermentation	0,194	0,202
Diminution après 27 jours	0,006	0,126
— 53 jours	0,085	0,166
— 93 jours	0,162	0,133
Variation centésimale de l'acidité fixe	15,23	20,86
Variation centésimale de l'acidité volatile	83,50	65,84

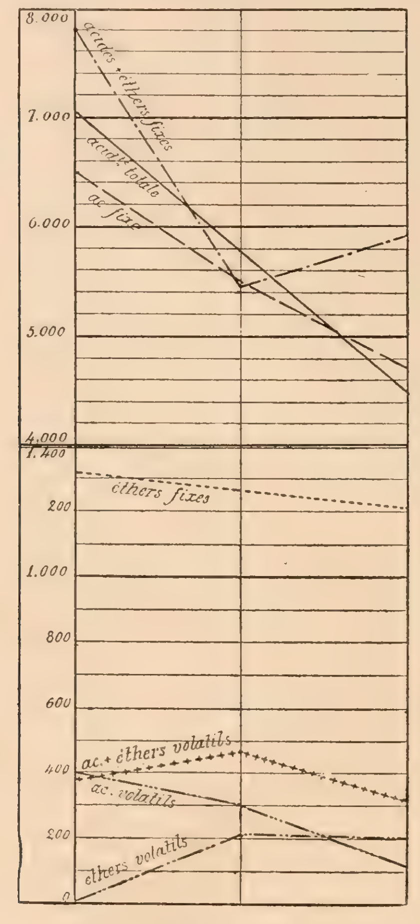


Fig. 6.

L'expérience nous apprend que l'addition de peptone fait disparaître l'acidité fixe plus rapidement, et l'acidité volatile plus lentement.

Dans une seconde expérience faite avec de l'eau de levure, voici les variations centésimales trouvées :

	Ballon sans peptone. F	Ballon avec 0,5 °/o peptone. F′
Diminution centésimale de l'acidité fixe après 13 semaines	— 27,9	— 65,9
Diminution centésimale de l'acidité volatile après 13 semaines	— 69,0	— 67,7

Nous constatons une diminution très forte de l'acidité fixe (acide succinique) ; il convient d'ajouter qu'à la suite de la deuxième prise, il s'est formé dans le ballon additionné de peptone, une abondante multiplication de levure qui a formé voile et dès lors a détruit très vite l'acidité existante ; la figure 6 nous montre la variation des divers éléments dans le ballon F depuis la première prise jusqu'à la dernière qui a eu lieu après 13 semaines.

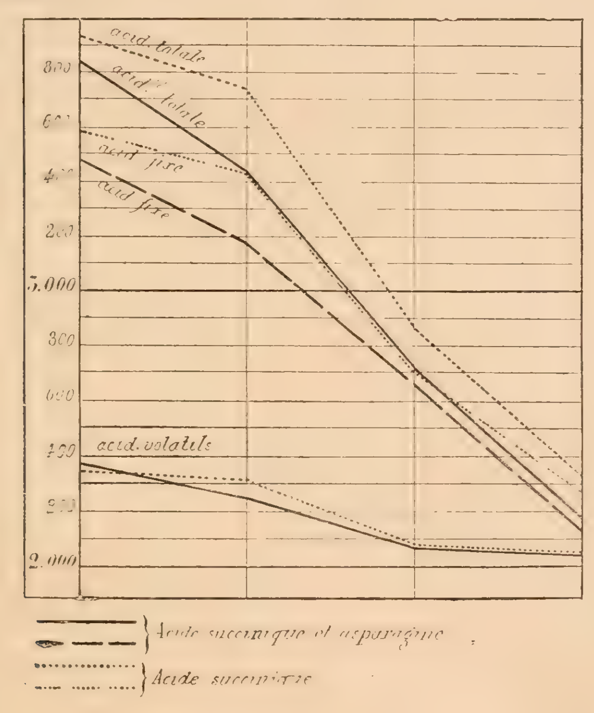


Fig. 7.

2me Expérience. — Etudions maintenant l'influence de l'asparagine ; prenons de l'eau de touraillons à 10 0/0 de saccharose, acidulée à l'acide succinique (ballon A) et additionnée, en outre, de 0,5 0/0 d'asparagine (ballon B) : faisons, comme d'habitude, les prises aux différents moments ; les résultats sont transcrits par les courbes de la figure 7 et indiqués dans le tableau suivant.

	A	B
Acidité à la fin de la 1re fermentation.........	3,934	3,835
Diminution après 24 jours....................	0,202	0,408
— 78 jours....................	1,063	1,109
— 119 jours....................	1,611	1,656
Acidité fixe à la fin de la 1re fermentation.....	3,583	3,467
Diminution après 24 jours....................	0,161	0,293
— 78 jours....................	0,780	0,806
— 119 jours....................	1,314	1,330
Acidité volatile à la fin de la 1re fermentation...	0,351	0,368
Diminution après 24 jours....................	0,041	0,115
— 78 jours....................	0,283	0,303
— 119 jours....................	0,297	0,326
Variation centésimale de l'acidité fixe........	36,67	38,36
Variation centésimale de l'acidité volatile.....	84,61	88,58

Cette expérience nous montre que l'addition d'asparagine n'a que très faiblement influencé la disparition des acides fixes et volatils.

Il resterait à voir l'influence de l'addition de phosphate d'ammoniaque. Nous ferons connaître, M. Dienert et moi, dans un travail spécial, les résultats obtenus sur ce point; je me bornerai à dire que, dans les milieux phosphatés, l'acidité augmente bien plus longtemps que dans les milieux non phosphatés : et ce n'est qu'au bout d'un temps assez long qu'on observe des diminutions; la température, la dose de phosphate et la nature de l'acide jouent ici un grand rôle.

D'une façon tout à fait générale, nous pouvons donc dire que la nature de l'élément azoté intervient très nettement dans la variation des acidités des boissons fermentées.

E) Influence de l'éducation reçue par la levure. — On sait que les levures peuvent conserver pendant quelque temps certains caractères acquis par éducation, et l'on pouvait se demander si des levures habituées par diverses générations successives à certains corps (phosphates, fluorures, acides) ne se comporteraient pas différemment des levures non traitées.

Voici les résultats constatés : une levure habituée à vivre dans un milieu acidulé à l'acide tartrique a fait disparaître les acides fixes un peu plus rapidement : quant aux acides volatils elle ne montrait aucune différence avec la levure non traitée.

On peut faire les mêmes remarques pour une levure habituée à vivre dans des solutions phosphatées.

Enfin, une levure habituée au fluorure d'ammonium fait disparaître plus rapidement les acides volatils et moins vite les acides fixes, soit que ces acides soient moins vite brûlés en

réalité, ou que la levure traitée produise plus d'acide succinique.

Mais en résumé nous pouvons dire que l'éducation des levures n'intervient que très faiblement au point de vue qui nous occupe.

F. *Influence de l'air.* — Pendant longtemps la disparition de l'acidité des vins a été considérée comme un simple phénomène chimique dû à l'action de l'oxygène; comme cet oxygène pénètre difficilement dans les vases vinaires et les bouteilles, la combustion devait être lente.

Schukow est venu nous apprendre qu'il pouvait y avoir un phénomène biologique, en montrant que l'aération n'agissait pas de la même façon dans les milieux pauvres ou riches en principes azotés.

L'aération peut avoir pour effet d'augmenter la multiplication de la levure, et il peut ainsi en résulter indirectement une plus forte diminution de l'acidité ; l'observation montre d'ailleurs que la diminution est la plus forte là où la levure mène le plus facilement la vie aérobie; les levures restant attachées au fond des vases font disparaître beaucoup moins d'acidité.

Aération ou quantité de levure agissent alors dans le même sens; signalons quelques expériences à l'appui de ce que nous venons dire.

1re *Expérience.* — Ensemençons de l'eau de touraillons sucrée contenue, d'une part, dans un vase plat et large, facilitant l'accès de l'air, d'autre part dans un tube de 80 centimètres de long. Aussitôt la première fermentation terminée, faisons une prise et abandonnons ensuite pendant trois mois.

	Culture en surface.	Culture en profondeur
Acidité totale à la fin de la 1re fermentation.....	7,62	7,75
Variation après 90 jours........................	— 0,28	— 0,14
Acidité fixe à la fin de la 1re fermentation......	7,40	7,53
Variation après 90 jours........................	— 0,12	— 0,10
Acidité volatile à la fin de la 1re fermentation.....	0,176	0,172
Variation après 90 jours........................	— 0,126	— 0,032
Variation centésimale de l'acidité fixe...........	1,7	1,3
Variation centésimale de l'acidité volatile.......	72	19

En présence de l'air, la diminution des deux acidités est donc activée, l'acidité fixe ne montre que de faibles variations : par contre l'acidité volatile a disparu dans de fortes proportions dans la culture en surface.

2e *Expérience.* — On ensemence du jus de raisin avec deux levures de vin 16 et 18; à la fin de la première fermentation on agite bien les ballons et on fait une prise de la moitié du liquide de chaque ballon; on fait l'analyse et on fait passer tout le reste à travers une bougie Chamberland flambée; on recueille dans des ballons flambés analogues à ceux qui ont conservé la moitié du liquide, en présence de la levure : ces deux ballons sont bouchés au coton comme les premiers, on pèse ensuite les ballons et on les abandonne pendant 2 mois 1/2 à 25°, on les ramène au poids primitif avec l'eau distillée et on analyse.

	Levure 16.	Levure 18.
Acidité totale à la fin de la fermentation.....	4,01	3,98
Variation après 75 jours en présence de levure.	— 0,12	— 0,48
Variation après 75 jours en présence de l'air seul..................................	— 0,06	— 0,09
Acidité fixe à la fin de la fermentation.......	3,59	3,80
Variation après 75 jours en présence de levure.	+ 0.14	— 0,31
Variation après 75 jours en présence de l'air seul..................................	— 0,02	— 0,05
Acidité volatile à la fin de la fermentation....	0,335	0,140
Variation après 75 jours en présence de levure.	— 0,206	— 0,135
Variation après 75 jours en présence de l'air seul..................................	— 0,034	— 0,028
Variation centésimale de l'acidité fixe en présence de levure..........................	+ 3,9	— 8,2
Variation centésimale de l'acidité fixe en présence d'air seul..........................	— 0,7	— 1,3
Variation centésimale de l'acidité volatile en présence de levure......................	— 62	— 96
Variation centésimale de l'acidité volatile en présence d'air seul......................	— 10	— 20

Cette expérience nous apprend que l'air n'intervient dans la disparition des acides que très faiblement; il agit surtout en favorisant la vie aérobie de la levure, les quantités de tartre étaient exactement les mêmes dans les deux ballons correspondant à la même levure.

3e *Expérience.* — Nous avons déjà cité une expérience où la disparition des acides était pour ainsi dire complète, grâce à une forte quantité de levure et grâce à l'arrivée facile de l'air : l'expérience suivante viendra la confirmer et nous montrer que c'est surtout l'acide succinique qui disparaît facilement.

On a réparti, entre une série de tubes et de vases coniques, de la levure, en quantité suffisante pour occuper plusieurs centimètres dans les tubes; on verse ensuite dans ces tubes et les vases coniques 50 c. c. d'eau de touraillon additionnée d'acide tartrique, ou d'acide malique, ou d'acide succinique, et on abandonne pendant 5 semaines à l'étuve; il y a toujours 2 tubes et 2 vases pour un même acide, c'est-à-dire peu d'air et beaucoup d'air en présence d'un poids de levure sensiblement le même.

POUR LES 50 C. C.

	Acidité à l'origine.		Acidité après 5 semaines.	Ethers totaux.
Acide tartrique	0,297	Tube 1...	0,270	
		— 2...	0,275	
		Vase 1...	0,267	
		— 2...	0,268	
Acide malique........	0,268	Tube 1...	0.142	
		— 2...	0,125	
		Vase 1...	0,116	
		— 2...	0,115	
Acide succinique	0,280	Tube 1...	0,248	0,026
		— 2...	0,251	0,014
		Vase 1...	0,072	0,052
		— 2...	0,060	0,067

La disparition de l'acide tartrique est pour ainsi dire nulle; l'acide malique disparaît aussi facilement en tubes qu'au large contact de l'air, enfin l'acide succinique disparaît surtout lorsque l'air est en suffisante quantité dans le vase de culture.

G. Influence de la température. — Nous savons que les diverses levures produisent des quantités variables d'acide succinique et d'acides volatils selon la température à laquelle a lieu la fermentation (10°, 25° ou 35°). Il était à prévoir qu'elles se comporteraient également d'une façon différente vis-à-vis des acides présents dans le liquide; c'est ce que l'expérience a confirmé.

1re *Expérience.* — On ensemence de l'eau de touraillons à 10 0/0 de saccharose, additionnée d'acide succinique, avec une levure de vin : aussitôt que le dégagement gazeux cesse, faisons une première analyse; abandonnons ensuite la moitié des ballons à l'étuve (25°), l'autre moitié à la cave (8 à 10°) pendant 9 semaines.

La différence maxima constatée pour l'acidité totale des ballons de l'étuve était de 4 centigrammes, tandis que ceux de la cave concordaient d'une façon remarquable : aussi pourrons-nous nous contenter des résultats d'un ballon de chaque série.

	Etuve	Cave.
Acidité totale à l'origine	6,313	6,350
Variation après 9 semaines..................	— 1,095	— 0,594
Acidité fixe à l'origine.........................	6,061	6,090
Variation après 9 semaines...................	— 0,978	— 0,429
Acidité volatile à l'origine....................	0,252	0,260
Variation après 9 semaines...................	— 0,120	— 0,165
Variation centésimale de l'acidité fixe	— 16,5	— 7,0
Variation centésimale de l'acidité volatile.....	— 48,9	— 61,1

Nous voyons qu'à la cave la disparition des acides volatils est plus élevée qu'à l'étuve; c'est l'inverse pour les acides fixes (acide succinique).

En est-il encore ainsi lorsque la dose des acides volatils a été portée à un taux plus élevé par l'addition d'acide acétique?

	Étuve.	Cave.
Acidité totale à la fin de la 1re fermentation...	8,073	8,073
Variation après 9 semaines	— 1,229	— 0,679
Acidité fixe à la fin de la 1re fermentation.....	6,061	6,070
Variation après 9 semaines....................	0,691	0,384
Acidité volatile à la fin de la 1re fermentation...	2,012	2,022
Variation après 9 semaines.......	— 0,538	— 0,305
Variation centésimale de l'acidité fixe.........	— 11,4	— 6,3
Variation centésimale de l'acidité volatile.....	— 26,7	— 15,0

Nous voyons d'abord que la disparition des acides fixes est moins rapide, ce que nous savions déjà; de plus qu'il existe, entre les nombres fournissant la variation centésimale pour les ballons de l'étuve et ceux de la cave, sensiblement le même rapport que dans l'expérience précédente; la diminution des acides volatils se fait également moins vite dans les deux ballons; elle est un peu plus forte dans les ballons placés à l'étuve, mais ceci peut s'expliquer par l'éthérification qui certes est plus forte à l'étuve qu'à la cave.

2e *Expérience.* — Ensemençons la levure de vin 1 dans l'eau de touraillons à 5 0/0 de saccharose et additionnée de 5 0/00 d'acide malique; la moitié des ballons est maintenue à 25°, l'autre moitié à 35°, l'acidité totale et fixe sont exprimées en acide succinique.

	à 25°	à 35°
Acidité totale à la fin de la fermentation.......	5,04	4,71
Variation après 20 jours........................	— 0,65	— 0,39
— 35 jours........................	— 0,84	— 0,98
Acidité fixe à la fin de la fermentation.........	4,87	4,55
Variation après 20 jours........................	— 0,63	— 0,38
— 35 jours........................	— 0,71	— 0,92
Acidité volatile à la fin de la fermentation.....	0,16	0,14
Variation après 20 jours........................	— 0,02	— 0,01
— 35 jours........................	— 0,12	— 0,05
Diminution centésimale finale de l'acidité fixe...	14,4	20,3
Diminution centésimale finale de l'acidité volatile	78	33,8

L'étude de l'influence de la température, dans les limites où la levure ne souffre pas, montre que la diminution des acides fixes libres est d'autant plus forte que la température est plus élevée; quant aux acides volatils, leur disparition passe par un maximum, la diminution est, en effet, moindre à 10° et à 35° qu'à 25°.

Mais, comme nous l'avons déjà dit, la température intervient surtout dans le phénomène de l'éthérification, et c'est par l'étude de cette influence que nous allons terminer ce travail.

II. Influence de l'éthérification. — Les expériences que nous avons passé en revue nous ont montré que l'acidité des liquides alcooliques laissés en présence de levures diminue plus ou moins rapidement, selon les conditions de l'expérience et selon la levure employée.

La proportion des acides volatils détruits ou disparus comme acides est beaucoup plus grande que celle des acides fixes, ce qui peut s'expliquer en un certain sens parce que ces acides volatils sont en quantités plus faibles; mais si l'on considère les quantités absolues, le poids d'acides fixes disparus dépasse celui des acides volatils.

On peut se demander jusqu'à quel point l'éthérification intervient dans le phénomène de la disparition des acides; c'est ce que j'ai essayé de voir en dosant les éthers formés dans quelques-unes de mes expériences. En faisant la somme des acides fixes et des éthers fixes, la somme des acides volatils et des éthers volatils aux différents moments d'une expérience, on avait une idée approximative de la marche du phénomène; je dis approximative, car d'une part nous avons vu qu'il pouvait y avoir augmentation d'acide fixe par suite de la formation d'acide succinique; de plus, dans le procès nutritif de la levure, il peut y avoir transformation de l'acide fixe en acide volatil, et on se trouve ainsi en présence d'une superposition d'effets très difficiles à démêler d'une façon précise.

Les figures 3, 4, 5, 6 nous montrent les variations trouvées dans différentes expériences. Complétons-les par quelques chiffres, ils nous diront que ces sommes calculées pour la fin de l'expérience, comparées à celles du début, sont en général inférieures, ce qui veut dire qu'il y a diminution réelle de l'acidité.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE — EAU DE LEVURE ADDITIONNÉE D'ACIDE SUCCINIQUE

	Début.	Après 3 mois.
Acides fixes calculés	6,486	4,678
Acides fixes trouvés à l'éther	5,738	4,398
Acides volatils	0,383	0,118
Ethers fixes	1,313	1,204
Ethers volatils	0,006	0,202
Somme des acides fixes calculés et des éthers fixes	7,799	5,882
Somme des acides fixes trouvés et des éthers fixes	7,051	5,598
Somme des acides volatils et des éthers volatils	0,389	0,320

DEUXIÈME EXPÉRIENCE — EAU DE LEVURE ADDITIONNÉE D'ACIDE SUCCINIQUE ET DE PEPTONE

	Début.	Après 3 mois.
Acides fixes calculés	5,688	4,501
Acides fixes trouvés par l'éther	5,350	3,615
Acides volatils	0,202	0,069
Ethers fixes	0,515	1,353
Ethers volatils	0,011	0,179
Somme des acides fixes calculés et des éthers fixes.	6,203	5,854
Somme des acides fixes trouvés et des éthers fixes.	5,865	4,968
Somme des acides volatils et des éthers volatils	0,213	0,218

Les diminutions d'acidité trouvées par MM. Kulisch, Wortmann dans des bouteilles de vin doivent donc être attribuées pour une bonne part à l'éthérification.

On le prouve par l'expérience suivante : Faisons fermenter en matras Pasteur 20 c. c. de jus de raisins avec diverses levures ; prélevons à l'aide de pipettes flambées le liquide fermenté et versons la levure dans du vin rendu stérile par la filtration à la bougie Chamberland : conservons alors ce vin dans des bouteilles préalablement stérilisées, entièrement remplies et bien bouchées qu'on abandonne ensuite à la cave : différents essais m'ont montré que dans ce cas la diminution de l'acidité est insensible.

Un vin ayant une acidité totale de 13gr,90 en acide tartrique et une acidité volatile de 0,214 a fourni les résultats suivants après 1 1/2 an de cave.

	Acidité totale.	Acidité volatile.	Éthers fixes.	Éthers volatils.
Vin témoin non filtré	9,862	0,379	2,140	0,403
Témoin filtré au Chamberland.	13,80	0,205	—	0,300
Ensemencé avec lev. 7 couché.	13,59	0,245	2,198	0,337
— — 83 —	13,22	0,222	2,067	0,333
— — 85 bouché au coton	11,89	0,186	2,391	0,365

L'acidité du témoin seule a varié, sans qu'il y ait des différences dans les éthers des divers vins; aucune des levures ensemencées n'a agi d'une façon efficace, peut-être parce que le milieu ne leur convenait guère, mais toutes étaient restées bien vivantes.

En serait-il de même dans des récipients où l'air pourrait pénétrer plus facilement ? Peut-être pourrait-on obtenir quelques résultats en ensemençant du moût de raisins acides, stérilisé préalablement, avec des levures sélectionnées, qui se seraient

ainsi habituées au début au milieu dans lequel on les prépare? C'est ce que seule l'expérience peut décider.

En résumé nous pouvons dire que la levure peut intervenir dans la disparition des acides, soit en les brûlant directement, soit encore indirectement en influant sur le phénomène de l'éthérification par l'alcool, la glycérine produits, etc.

Cette étude montre en outre combien tout ce qui se rattache aux levures et à la fermentation alcoolique, simple en apparence, peut changer d'allure par suite de circonstances souvent insignifiantes, de façon à rendre fort difficile l'explication des divers cas qui peuvent se présenter.

BIBLIOGRAPHIE

Pasteur. — Études sur les vins, 1866 et 1873.

Duclaux. — Recherches sur les vins. *Annales de chimie et de physique*, 5e série, 1874.

Naegeli. — Ernährung der niederen Pilze. *Sitzungsbericht der bayr. Akademie* 1879.

Goethe. — Disparition de l'acidité dans les cidres. *Jahresbericht fur Gartenkunde und Botanik*, 1884.

A. Czeh-Muller-Thurgau. — *Weinbau u. Weinhandel*, 1888.

Kulisch. — Uber das Abnehmen der Saüre in Obst und Tranbenwein während, der Gährung und Lagerung. *Weinbau u. Weinhandel*, 1889 et 1895.

Muller-Thurgau. — *Weinbau u. Weinhandel*, 1895.

Meissner. — Mittheilung uber Weinbau u. Kellerwirthschaft, 1896.

Schukow. — Uber den Saureverbrauch der Hefen. *Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk.* II Abth, 1896.

Wortmann. — Id. 1897, p. 96.

Koch. — XVI. Deutsch. Weinbauc ongress, 1897.

Wortmann. — Wirkung lebender Organismen in fertigen Weinen, 1898.

Portele et Mach. — Même sujet, 1892.

REVUES ET ANALYSES

LE PROCÉDÉ D'ÉPURATION DES EAUX D'ÉGOUT

PAR LE

PROCÉDÉ DU SYNDICAT DES « RÉSERVOIRS SEPTIQUES » D'EXETER ET DE WESTMINSTER

REVUE CRITIQUE

Tous les efforts tentés en vue de perfectionner les procédés d'épuration des eaux d'égout méritent d'attirer l'attention des hygiénistes. Les lecteurs de ces *Annales* connaissent le procédé de l'épandage tel qu'il est pratiqué dans la plupart des villes qui l'ont adopté. (Ces *Annales*, 1890.) M. Duclaux les a également mis au courant des expériences de M. Hiram Mills à la station expérimentale de Lawrence, dans le Massachusetts, sur l'épuration par les filtres artificiels. (Ces *Annales*, 1892.)

Le Syndicat des « Réservoirs septiques » d'Exeter a exposé au Palais du Génie civil, à l'Exposition universelle de 1900 à Paris, un appareil d'épuration qui dénote un effort vers une amélioration sur le procédé des filtres artificiels.

Les villes qui ne disposent pas de terrains perméables susceptibles d'être utilisés pour l'épandage pouvaient recourir au procédé de M. Hiram Mills. On sait que ce savant a montré que c'est le sable grossier qui réunit le mieux les conditions d'une bonne épuration. Les vides qui restent entre les éléments du sable doivent être suffisamment grands pour empêcher l'eau de se maintenir dans la masse par la force de la capillarité. On a observé en effet que les phénomènes d'oxydation s'atténuent ou s'arrêtent complètement au sein des liquides chargés de matières organiques. Un filtre d'épuration ne doit pas seulement être perméable à l'eau ; il faut qu'il le soit aussi à l'air libre, dans les intervalles du fonctionnement qui, toujours en vue d'une combustion active, doit être intermittent.

Un filtre ainsi constitué est capable, pour une profondeur de 2 mètres, d'épurer d'une façon très satisfaisante une épaisseur d'eau d'égout de 135 millimètres en 24 heures, ce qui correspond à un volume de 1,350 mètres cubes à l'hectare.

On conçoit cependant qu'il ne faudrait pas déverser, sur un pareil filtre, les eaux telles qu'elles sortent des égouts, avec la paille, le papier et autres matières grossières qu'elles entraînent. Les vides se combleraient en quelques jours par colmatage, et la circulation de l'air y serait rendue impossible. Il faut débarrasser les eaux d'égout de tous les détritus un peu volumineux qu'elles charrient ; de là un excès de travail et d'entretien permanents.

Le procédé d'Exeter tend à supprimer cet inconvénient. Les matières organiques solides, composées pour la plus grande partie de cellulose, peuvent en effet être gazéifiées par des procès biologiques : et c'est le dispositif adopté en vue de réaliser cette partie très importante de l'épuration qui constitue au point de vue théorique l'innovation de cet appareil.

Les eaux sont reçues dans une petite chambre, dite chambre à gravier, dont le but est d'amortir le courant afin de permettre au sable de se déposer. De là elles passent, par une ouverture pratiquée au-dessous du niveau de l'eau, dans un grand réservoir clos en briques cimentées, appelé « Réservoir septique ». Le volume de ce réservoir est suffisant pour recevoir toutes les eaux déversées par les égouts en 24 heures ; celles-ci y séjournent donc 24 heures, et pendant ce temps elles laissent déposer toutes les matières qu'elles tiennent en suspension. Le réservoir doit être développé surtout suivant la longueur, de cette façon il s'y établit un courant insensible qui fait que l'eau affluente se présente au bout de 24 heures à l'orifice de sortie. En ce point, elle est opalescente, légèrement teintée de brun, mais presque entièrement dépourvue des matières solides en suspension.

Une conduite, dont l'ouverture est placée au-dessous du niveau des eaux, les conduit alors dans un filtre ouvert à l'air libre, conçu d'après les notions fournies par M. Hiram Mills. Ce filtre à une profondeur de $1^m,60$; il est rempli de mâchefer cassé qui remplace le sable grossier. La surface filtrante est divisé en cinq parties d'égale surface formant autant de filtres indépendants ; quatre fonctionnent pendant que le cinquième se repose ; la période de travail est donc quatre fois plus longue que la période de repos, laquelle revient pour chacun des filtres à tour de rôle.

Ces bassins filtrants se remplissent ou se vident par un système de vannes commandées par la hauteur d'eau qu'ils retiennent. Le fonctionnement est donc automatique ; chaque filtre met 6 heures pour se remplir : le remplissage se fait par déversement en nappe mince par-dessus les bords d'une rigole placée à la surface du filtre. Grâce à ce dispositif, l'eau qui sort privée d'oxygène du réservoir clos s'aère rapidement par un large contact avec l'atmosphère, augmenté encore par l'état de division provoqué par le déversement à travers la couche

de mâchefer. Quand le filtre est plein, le jeu des vannes supprime la communication avec le réservoir clos en même temps qu'il le rétablit avec un deuxième filtre; le premier reste plein pendant 6 heures et se vide rapidement. Chaque filtre fonctionne donc environ 12 heures et demie sur 24, savoir : 6 heures de remplissage, 6 heures de plein, et une demi-heure de vidange; le reste du temps, il demeure vide.

Les eaux épuisées peuvent être déversées directement dans un cours d'eau ou utilisées par l'agriculture pour les irrigations.

Pour suivre les progrès de l'épuration dans les deux parties de l'appareil (réservoir clos et bassins filtrants), j'emprunterai les renseignements chimiques au rapport de M. Rideal sur l'installation d'Exeter, destinée à traiter les eaux d'égout d'un quartier de la ville peuplé de 2.000 habitants. Je mettrai également à contribution le rapport de M. G. Sims Woodhead, qui s'est occupé de la partie bactériologique de la question.

Le réservoir clos ne se borne pas à provoquer la sédimentation des matières organiques en suspension dans les eaux; il est le siège d'un travail biologique très actif, accompli par les espèces microbiennes qui le peuplent; la vie aérobie et la vie anaérobie y sont possibles; mais il est évident que c'est celle-ci qui prédomine; la première n'est possible qu'au débouché de la conduite d'arrivée; elle est alimentée par l'oxygène dissous dans les eaux à l'entrée; ce sont donc les ferments anaérobies qui sont les agents de dégradation de la matière organique dans le réservoir clos.

L'analyse chimique permet de mettre en évidence les modifications apportées dans la composition des eaux pendant 24 heures environ de stationnement dans le réservoir. Voici les chiffres obtenus par M. Rideal avec des échantillons pris à l'entrée et à la sortie; ceux-ci étant prélevés 24 heures après les premiers de façon à opérer autant que possible sur la même eau. Les chiffres sont calculés pour 100,000 parties d'eau.

	Extrait.	Oxydabilité.	Am. libre.	Am. albuminoïde.	Nitrites.	Azote des Nitrates	Azote total.	Azote organique.
Eaux d'égout à l'entrée du réservoir..	46.8	6,56	3,6	1,40	0	0	7,3	4,4
Eaux d'égout à la sortie, prises 24 heures après	48,6	4,32	4,9	0,64	Traces.	0,04	6,27	2,2

Il y a donc plus d'extrait à la sortie qu'à l'entrée; cela prouve que les diastases microbiennes ont dissous une certaine quantité de matières solides. D'une manière générale, on voit que la matière organique se dégrade peu à peu dans le réservoir et prend une forme

plus simple; la preuve en est donnée par l'augmentation de l'ammoniaque, la diminution de la matière albuminoïde et par l'oxydabilité moins grande de l'eau.

Ce travail accompli, l'épuration n'en sera que plus rapide et plus complète dans le filtre. Mais ce n'est là qu'un des côtés et assurément le moins intéressant du rôle du réservoir clos. Si son action se bornait à ces modifications, l'appareil d'Exeter ne constituerait pas une amélioration sensible sur le filtre de M. Hiram Mills, car les dégradations mises en évidence par les chiffres précédents s'accompliraient aussi bien, et peut-être plus aisément dans des couches filtrantes activement aérées.

Ce qui nous intéresse surtout, c'est le sort réservé au dépôt de matières cellulosiques qui se forme au fond du réservoir.

Si ces substances sont soumises à une fermentation microbienne, on doit pouvoir retrouver les produits de dislocation, soit à l'état gazeux dans l'atmosphère du réservoir, soit à l'état dissous dans les eaux. De ces derniers, on ne nous parle pas. M. Rideal nous signale, parmi les premiers, l'acide carbonique, le formène ou méthane, et l'hydrogène. Les prises de gaz effectuées un peu au-dessous du niveau du liquide et dans la conduite qui part du réservoir ont fourni des mélanges de la composition suivante :

Acide carbonique	0,6	0,3
Méthane	24,4	20,3
Hydrogène	36,4	18,2
Azote par différence	36,8	61,2
	100,0	100,0

Remarquons que la teneur du mélange en acide carbonique est relativement très faible; par contre il est riche en hydrogène et en formène: les gaz mis en liberté dans le réservoir septique sont donc inflammables et susceptibles d'être brûlés à la sortie de l'appareil, de sorte que les fermentations anaérobies qui se produisent dans le réservoir clos ne peuvent pas répandre au dehors d'odeurs désagréables.

Les chiffres précédents méritent une interprétation plus détaillée, mais auparavant il est bon de rappeler ce que l'on sait de précis sur les fermentations des matières cellulosiques. C'est une question sur laquelle la littérature est pauvre de détails. Les recherches les plus fructueuses ont été faites par M. Gayon en 1882 et 83. (*C. R.*, t. 98, p. 528, et *Soc. nat. d'agric.*, 27 juin 1883). M. Gayon a étudié la fermentation forménique du fumier; il remplissait des bonbonnes avec du fumier et de l'eau et au bout de quelques jours il observait un abondant dégagement de gaz inflammable qu'il faisait brûler pendant

toute la durée de l'expérience à l'orifice d'un tube effilé. Ce gaz combustible était constitué par du formène; l'hydrogène était absent. M. Gayon a pu obtenir, avec 1 mètre cube de fumier et d'eau, 100 litres de formène par 24 heures à la température de 35°. C'est une fermentation active comme on le voit. Elle est produite par un bacille fin, qui peut être isolé et cultivé à l'état de pureté dans un liquide nutritif renfermant de la paille ou du papier; il décompose, en culture pure, la cellulose du papier avec dégagement de formène et d'acide carbonique.

Vers la même époque M. Dehérain[1] constatait que les gaz du fumier sont constitués presque exclusivement par du formène, dans certaines parties seulement du tas en fermentation; mais il n'a pas trouvé d'hydrogène; M. Reiset avait d'ailleurs déjà signalé le formène dans les fumiers en fermentation.

M. Hoppe-Seyler[2] obtint aussi du formène impur en faisant fermenter du papier de Suède dans un liquide nutritif avec des microbes pris dans la vase du cours d'eau.

Cependant, tout récemment M. Omeliansky[3] a mis en évidence une fermentation de la cellulose du papier qui ne donne que de l'hydrogène et de l'acide carbonique, mais cette fermentation est très lente, de même que celle qui a été observée par M. Hoppe-Seyler; elles durent des mois et même des années avec quelques grammes seulement de cellulose.

A côté de ces ferments de la cellulose vraie, c'est-à-dire de celle qui forme les fibres du lin ou le papier de Suède, il faut signaler toute une classe de microbes, les ferments butyriques, capables de décomposer les hydrates de carbone qui se rapprochent de la cellulose vraie par leur composition et par leur dissémination de la nature; ils se développent également à l'abri de l'air, en produisant de l'hydrogène, de l'acide carbonique, des acides volatils et des alcools primaires[4].

De ce court aperçu on peut tirer les conclusions suivantes :

Une fermentation forménique pure ne donne pas naissance au gaz hydrogène; si donc on constate la présence de ce dernier, on doit en déduire qu'on a affaire à une fermentation du genre de celle qui a été signalée par M. Omeliansky, ou bien à une ou plusieurs fermentations butyriques.

La présence de l'hydrogène nous autorise en outre à affirmer qu'il y a une production abondante d'acides volatils, tels que les acides formique, acétique, butyrique, qui restent dans le liquide et qui ont par

1. *C. R.*, t. 98, p. 377.
2. *Zeit. für phys. Chemie* X, 1886.
3. *Arch. des Sciences biol. de St-Pétersb.*, t. VII, p. 411.
4. Van Tieghem, *Bulletin de la Soc. Bot. de Fr.*, 1877 et 79.

conséquent une grande influence sur la réaction du milieu et la nature des fermentations qui s'y produisent.

Enfin, une troisième remarque : M. Omeliansky, qui a essayé de reproduire la fermentation observée par M. Hoppe-Seyler, n'y est pas parvenu; il a obtenu celle que je viens de rappeler, cela veut dire que tous ces microbes capables de détruire la cellulose sont très sensibles à des influences qui nous échappent, de sorte qu'il est jusqu'ici impossible de reproduire à volonté telle ou telle fermentation de la cellulose.

Si maintenant on examine à la lumière de ces résultats les chiffres fournis par M. Rideal, on peut dire que le réservoir clos est le siège de plusieurs modes de fermentation des matières hydrocarbonées insolubles, et en particulier de la cellulose ; puisqu'il y a production d'hydrogène, il y a aussi formation de quantités relativement grandes d'acides volatils (dans les expériences de M. Omeliansky ils représentaient 70 0/0 de la cellulose détruite). La réaction du milieu varie donc d'un point à un autre dans le réservoir, ce qui veut dire que les conditions faites aux microbes sont très instables, et ce ne sont pas celles qui y sont réalisées qui favorisent la fermentation forménique, puisque, suivant l'observation de M. Schlœsing[1], celle-ci prend dans ces conditions le pas sur les autres.

La réaction variera aussi avec la nature des eaux; elle ne sera pas la même avec une eau fortement calcaire par exemple et une eau qui provient de terrains primitifs complètement dépourvue de chaux; c'est encore un point à considérer.

On se demande donc dans quelle mesure le réservoir clos accomplit cette partie si importante de l'épuration des eaux d'égout ; on voit par ce qui précède qu'il est impossible de se prononcer, d'après les chiffres que nous fournit le rapport de M. Rideal. Il faut une étude bactériologique détaillée de tous les ferments de la cellulose qui peuvent se rencontrer dans le réservoir, ou bien des chiffres qui nous donnent la quantité de cellulose détruite dans un temps donné et la quantité reçue par le réservoir dans le même temps.

La seule allusion à ce dernier point se trouve dans la remarque suivante de M. G. Sims Woodhead : « Nous savions que les couches de boue du fond du réservoir paraissent s'accroître très peu en épaisseur, et nos propres expériences confirment ce fait, car l'augmentation du dépôt après plusieurs mois de fonctionnement était effectivement très faible. »

Pour permettre au lecteur de se former une opinion, il faut des nombres et non des évaluations approximatives : la question d'ailleurs présente assez d'intérêt pour être résolue méthodiquement.

La seconde partie de l'appareil doit accomplir un travail plus facile

1. *C. R.*, 1889, t. 109, p. 835.

à concevoir; en un mot, elle doit transformer tout l'azote organique et ammoniacal en nitrates. Tout y est d'ailleurs ménagé, comme je l'ai dit, pour activer au maximum les phénomènes de combustion que les microbes sont capables de produire. On sait que les milieux alcalins sont particulièrement favorables à ce genre de fermentations, et cette remarque nous conduit encore à faire observer que les eaux sortant du réservoir clos ne doivent pas toujours remplir cette condition; si par exemple elles sont acides, le mâchefer ne leur cédera pas assez de composés basiques pour neutraliser leur acidité, et alors les phénomènes d'oxydation se feront moins bien et moins vite; en particulier la transformation de l'ammoniaque en nitrate sera plus difficile, parce que cette transformation sera accompagnée d'une augmentation rapide du taux d'acidité. On doit donc retrouver dans les eaux filtrées plus d'azote ammoniacal que d'azote nitrique.

Dans les filtres ordinaires, dans les sols siliceux utilisés pour l'épandage, la réaction de la matière filtrante n'a pas d'importance, parce que les eaux d'égout, en général ammoniacales, ne deviennent acides que lorsque l'épuration est terminée; et alors les eaux entraînent avec elles les substances qui pourraient gêner le travail ultérieur des filtres; dans le procédé d'Exeter cet inconvénient se fait sentir dès le début de la combustion dans les filtres, à cause du long séjour que les eaux font dans le réservoir clos.

Le tableau suivant emprunté à M. Rideal résume la marche de l'épuration dans tout l'appareil; les analyses portent sur deux séries d'échantillons pris à l'entrée et à la sortie du réservoir clos, et à la sortie des filtres, afin de bien montrer le rôle de chacune des deux parties de l'installation :

1re *série.*	Extraits.	Oxydabilité.	Am. libre.	Am. albuminoïde.	Nitrites.	Azote des nitrates.	Azote total.	Azote organique.
Eaux d'égout à l'entrée du réservoir..	46,8	6,56	3,6	1,40	0	0	7,4	4,4
A la sortie du réservoir...............	48,6	4,32	4,9	0,64	Traces.	0,041	6,24	2,2
Après la filtration...	42,4	0,78	2,48	0,45	Traces.	0,30	4,5	2,2
2e *série.*								
Eaux à l'entrée du réservoir............	55,	3,61	8,05	4,03	Traces.	0,02	12,82	5,8
A la sortie du réservoir...............	59,0	2,73	11,2	2,66	Traces.	0,022	14,92	5,7
Après la filtration....	49,9	1,13	6,05	0,87	Sensible.	1,06	10,46	4,4

Ces chiffres montrent que les eaux renferment encore une trop forte proportion d'azote organique et d'azote ammoniacal; elles sont en somme relativement pauvres en nitrates; il y a beaucoup plus d'azote à l'état d'ammoniaque qu'à l'état de nitrates; c'est le contraire

que l'on devrait observer; ces résultats confirment donc ce que j'ai dit sur le rôle de l'acidité développée dans le réservoir septique; mais il ne faudrait pas cependant les attribuer exclusivement à cette cause; ils sont dus peut-être aussi, en partie du moins, au mode de fonctionnement imposé aux filtres. Il est à peu près certain que les phénomènes d'oxydation sont complètement arrêtés dans la masse du filtre durant les six heures pendant lesquelles il reste plein. L'oxygène dissous pénètre à peine sur une profondeur de quelques centimètres dans un milieu aussi peuplé de bactéries aérobies, de sorte que les fermentations anaérobies réapparaissent rapidement au sein de l'eau.

L'oxydabilité a baissé beaucoup pendant la filtration; cela prouve que la matière organique qui reste absorbe peu d'oxygène; l'ammoniaque restante peut en outre être déversée, sans inconvénient, dans un cours d'eau parce qu'elle se transforme rapidement en nitrate; mais la conclusion qui se dégage de ces chiffres est que l'épuration n'est pas assez avancée au moment où les eaux quittent le filtre.

L'étude chimique que je viens de résumer a été complétée par une étude biologique des ferments qui peuplent le réservoir clos et les filtres. Des recherches bactériologiques bien dirigées pourraient nous renseigner sur la nature des fermentations qui se produisent dans le réservoir clos; ces fermentations ne sont pas encore très bien connues, comme j'ai eu déjà l'occasion de le faire observer.

M. Sims Woodhead n'a pas abordé la question sous ce point de vue. Il s'est attaché à faire des numérations de microbes, à caractériser les espèces prédominantes qu'il a pu isoler et à les étudier dans leurs rapports avec la dégradation des matières azotées, en prenant comme terme de comparaison la liquéfaction de la gélatine.

La plupart des espèces microbiennes obtenues par des isolements faits sur plaques de gélatine possèdent, d'après M. Woodhead, la propriété de nitrifier l'azote ammoniacal dans l'eau recueillie à la sortie du réservoir clos et stérilisée par filtration à travers une bougie Chamberland. Il y a là, évidemment, une faute de manipulation, ou une erreur d'observation manifeste. Les ferments nitrifiants sont aujourd'hui parfaitement connus par les travaux de Winogradsky [1]; il est absolument impossible de les isoler par le procédé employé par M. Woodhead; on sait également, d'après les recherches de M. Omeliansky [2], que l'azote ammoniacal, à l'exclusion des amines et des amides, est seul susceptible d'être oxydé par les ferments nitrifiants.

L'auteur a tiré un meilleur parti des numérations qu'il a faites. On sait en effet que M. Hiram Mills a mis en évidence ce fait que plus les microbes nitrifiants prennent possession du milieu, plus grande est la

1. Ces *Annales*, 1890 et 1893.
2. *Archives des sciences biol.*, t. VII, p. 273.

pureté de l'eau au point de vue du nombre de microbes banaux qu'elle renferme. En d'autres termes, le nombre de microbes cultivables, présents dans les eaux d'égout, diminue rapidement avec les progrès de la gazéification et de la minéralisation de la matière organique. Ce fait n'est pas spécial aux filtres artificiels ; on l'a également vérifié dans l'épuration naturelle par le sol et par les fleuves. Ainsi, par exemple, l'eau de la Seine renfermait, en 1895, 78,000 bactéries par c. c. à son entrée dans Paris, 159,000 au centre de la ville, 2,813,000 après le débouché du collecteur de Clichy, puis à Meulan où l'épuration est déjà complète 275,000, et, enfin, 272,000, un peu plus en aval, à Mantes[1].

Les chiffres obtenus par M. Woodhead n'accusent pas cette décroissance. Les eaux d'égout renferment de 3 à 5 millions de bactéries par c. c. à leur entrée dans le réservoir septique, 1 million à leur sortie du réservoir, et de nouveau 3 à 5 millions à la fin de la filtration, en ne tenant compte que des espèces aérobies. La conclusion qui découle de ces chiffres est identique à celle qui a été fournie par l'analyse chimique : ils témoignent d'une manière irrévocable que l'épuration n'est pas complète au moment où l'on évacue les eaux des filtres.

Une eau aussi riche en microbes doit être plus ou moins opalescente ; c'est justement la remarque que fait M. Rideal sur la plupart des échantillons qu'il a observés. Ces échantillons étaient incolores et sans odeur, mais présentaient souvent une légère opalescence qui a disparu au bout de quelques jours sans donner de dépôt visible.

Ce louche était dû très probablement aux bactéries en suspension ; le liquide a repris la limpidité à la suite de la dissolution des corps microbiens sous l'influence des diastases qu'ils avaient abandonnées à l'eau. C'est un exemple d'autophagie assez commun dans le monde des microbes.

En résumé, l'appareil d'épuration des eaux d'égoût exposé au Palais du Génie civil semble reposer sur des principes théoriques qui sont en parfait accord avec les notions que la science a conquises dans le domaine des transformations biologiques produites par les microbes. Malheureusement il y a loin de la théorie à l'application pratique. Ce procédé réclame encore une étude minutieuse dont j'ai signalé quelques points en passant ; les résultats qu'il fournit dans les conditions actuelles de son fonctionnement laissent encore place à des améliorations.

1. Duclaux. *Traité de chimie biol.*, t. I., Paris 1898. Masson.

P. Mazé.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

Le Gérant : G. Masson.

14me ANNÉE OCTOBRE 1900 N° 10

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

Immunisation de la Bactéridie charbonneuse CONTRE L'ACTION DU SÉRUM DU RAT

Formation et nature des « anticorps »

Par J. DANYSZ

Dans son travail sur l'action bactéricide du sérum de rat, Savtchenko[1] a montré que la bactéridie charbonneuse peut s'habituer au sérum de rat et donner, dans ce milieu, des cultures assez abondantes.

Il était généralement admis, alors, que le sérum de rat contenait une alexine ou bactériolysine qui tuait et digérait les microbes, et il nous a semblé intéressant d'établir par quel mécanisme le microbe parvenait à se défendre contre l'action nocive de cette substance.

On pouvait admettre soit une adaptation du microbe par formation de tissus nouveaux de plus en plus résistants à l'action de la substance bactéricide, soit une immunisation par formation d'un anticorps qui neutraliserait cette substance au dehors du corps du microbe.

Pour avoir un terme de comparaison et pouvoir mieux juger la signification des phénomènes observés, nous avons étudié en même temps l'accoutumance de la bactéridie à l'arsenic, c'est-à-dire à un antiseptique dont l'action, ainsi que l'a constaté Besredka[2], conduit à la formation d'un anticorps.

L'action du sérum de rat. — Pour fixer la puissance d'action

1. Ces *Annales*, 1897, N° 12.
2. Ces *Annales*, 1899, p. 49, 209, 465.

du sérum de rat sur la bactéridie, nous avons commencé par ensemencer des quantités aussi identiques que possible, mais toujours relativement faibles (2 gouttes d'une émulsion claire dans l'eau physiologique d'une culture de 24 heures dans 1 c. c. de liquide), de 1er, de 2e vaccin et d'une culture virulente, dans une série de 20 mélanges contenant, le 1er, 19 gouttes de bouillon pour 1 goutte de sérum, le 2e 18 gouttes de bouillon pour 2 gouttes de sérum, etc. ; le dernier contenait du sérum pur.

Le résultat était examiné 36 heures après l'ensemencement.

En représentant l'abondance de la culture témoin par le chiffre 15, on trouvait, pour la série des mélanges, les valeurs suivantes :

Nos des tubes.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Abondance de la culture.	1er V.	20	18	16	14	12	10	9	7	5	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2e V.	20	18	17	16	14	12	11	10	7	5	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0
	Virus	20	19	18	17	16	14	12	10	9	7	5	3	2	1	0	0	0	0	0	0

Les limites de croissance étaient donc dans ce cas :

Pour le 1er vaccin, tube no 11, solution 9 de bouillon pour 11 de sérum.
Pour le 2e — — no 13, — 7 — — 13 —
Pour le virus, — no 14, — 6 — — 14 —

En augmentant les quantités de culture ensemencée dans ces séries de mélanges, on fait avancer les limites de croissance de gauche à droite. Des émulsions épaisses de bactéridies peuvent donner des cultures dans du sérum pur.

On obtient des résultats contraires en remplaçant le bouillon par de l'eau physiologique ou l'eau distillée. Pour les mêmes quantités de sérum et de culture ensemencées, les limites de croissance se trouvent reculées de droite vers la gauche.

Pour les mélanges de sérum et d'eau physiologique, ces limites sont, par exemple :

1er vaccin......... Tube no 9, solution 11 d'eau pour 9 de sérum.
2e — .... — no 12, — 8 — 12 —
Virus............. — no 13, — 7 — 13 —

Pour les mélanges de sérum et d'eau distillée :

1er vaccin......... Tube no 7, solution 13 d'eau pour 7 de sérum.
2e — .... — no 9, — 11 — 9 —
Virus............. — no 10, — 10 — 10 —

Les courbes de croissance des bactéridies dans l'eau distillée et dans l'eau salée présentent encore une autre particularité

qu'il est important de signaler : l'optimum de croissance ne correspond pas à la quantité minima du sérum dans les mélanges. On obtient cet optimum dans les tubes 2 ou 3 pour l'eau physiologique, dans les tubes 3 ou 4 pour l'eau distillée.

Dans l'hypothèse de l'existence d'une bactériolysine contenue dans le sérum de rat, on serait donc obligé de conclure de cette première série d'essais :

1° Que la puissance d'action de cette diastase est plus forte dans l'eau distillée que dans l'eau physiologique, et plus forte dans ce dernier milieu que dans le bouillon;

2° Que le 1er vaccin est plus sensible à l'action de cette diastase que le 2e vaccin, et ce dernier plus sensible que le virus;

3° Que les doses faibles de sérum favorisent la croissance des microbes au lieu de les détruire, et que son action ressemble en cela à l'action des antiseptiques. Ce dernier phénomène apparaît surtout très nettement dans des milieux nutritifs très pauvres.

Le mécanisme de l'immunisation de la bactéridie contre le sérum de rat. — Nous avons constaté plus haut que, de toutes les races de bactéridies, c'est le 1er vaccin qui est le plus sensible à l'action du sérum de rat : c'est donc une culture de 1er vaccin que nous avons cherché à immuniser, simplement dans le but d'obtenir des différences plus appréciables entre une culture traitée et une culture neuve.

En prenant comme point de départ le mélange de sérum et de bouillon qui donne « l'optimum » de croissance, on arrive assez facilement à habituer la bactéridie à se développer dans des mélanges de plus en plus concentrés.

L'immunisation de la bactéridie présente toutefois cette particularité qu'au début elle marche très vite, et qu'ensuite elle se ralentit de plus en plus. — Il ne faut qu'une dizaine de passages pour faire avancer la limite de la croissance de 11 à 15, tandis qu'il en faut au moins 20 pour l'avancer ensuite jusqu'au n° 19 et encore autant pour la faire passer de 19 à 20.

Une culture immunisée a sensiblement changé d'aspect et de propriétés. Sur gélose elle présente un aspect terne et velu qui la fait ressembler au virus; examinés au microscope, les microbes sont plus gros que ceux de la culture d'origine, et entourés

d'une gaine mucilagineuse presque aussi épaisse que la moitié du corps du microbe. Émulsionnée dans de l'eau physiologique ou dans l'eau distillée, la culture ne reste pas en suspension comme le fait le vaccin, mais s'agglutine très rapidement et s'amasse au fond du tube en quelques minutes. C'est encore là une particularité qui la rapproche du virus. Cette ressemblance est, toutefois, purement morphologique; une culture habituée au sérum de rat est sensiblement moins virulente que la culture d'origine.

Une telle culture garde très longtemps les propriétés acquises. Une culture ensemencée directement du sérum sur gélose et une autre entretenue pendant trois mois par réensemencements successifs, exclusivement sur gélose normale, ne diffèrent pas d'une façon appréciable.

La modification morphologique la plus apparente que le microbe a subie par l'immunisation contre l'action du sérum de rat est la formation de la gaine mucilagineuse dont il s'entoure. L'existence de cette gaine nous indique la direction dans laquelle il faut chercher la façon dont le microbe se défend. Il est évident, en effet, que c'est cet épaississement de la membrane d'enveloppe qui protège le microbe contre l'action nocive du sérum de rat, soit en s'opposant passivement au passage des substances actives, soit en les neutralisant en dehors du corps du microbe.

L'expérience nous apprend que c'est cette dernière hypothèse qu'il faut nécessairement admettre.

En effet, on peut épuiser la substance nocive du sérum du rat en centrifugeant des émulsions de bactéridies dans ce sérum; après deux ou trois de ces opérations, le sérum décanté n'est plus bactéricide, et on constate aussi qu'il faut à peu près deux fois moins de bactéridies immunisées que de bactéries neuves pour épuiser la même quantité de sérum. — Les bactéridies prennent donc la substance nocive, elles la fixent proportionnellement à leur quantité et proportionnellement à leur degré d'immunisation.

D'autre part, on remarque que les bactéridies immunisées, cultivées dans du bouillon normal, ne possèdent pas cette gaine mucilagineuse dont elles s'entourent dans des cultures sur gélose. Eh bien, quand on cultive, dans des conditions identiques,

dans du bouillon, la bactéridie immunisée et la bactéridie neuve, quand on filtre ces cultures sur porcelaine et qu'on essaie le pouvoir neutralisant de ces bouillons filtrés pour le sérum de rat, comparativement à du bouillon normal, on trouve que le liquide dans lequel s'est développée la bactéridie immunisée neutralise sensiblement plus de la substance nocive que le bouillon de culture de la bactéridie normale, et ce dernier un peu plus que le bouillon neuf.

En ensemençant des quantités égales d'une émulsion de bactéridies normales dans trois séries de mélanges préparés dans les mêmes conditions que ceux indiqués plus haut, et contenant, pour des quantités respectivement identiques de sérum de rat, des quantités identiques aussi, dans la 1re série de tubes, de bouillon neuf, dans la 2e série, de bouillon d'une culture normale, dans la 3e série, de bouillon d'une culture immunisée, on constate que, si dans le premier cas la limite de croissance est atteinte dans le tube n° 10, dans le deuxième cas elle atteindra le n° 14, et, dans le dernier, le tube n° 18.

Les réactions des bouillons 2 et 3 étant identiques, la différence d'action ne peut provenir que de la différence dans les quantités de substance fixatrice sécrétée par les microbes et dissoute dans les deux bouillons.

Il faut donc conclure que la gaine mucilagineuse qui entoure le microbe immunisé joue un rôle actif dans la défense de ce dernier, en fixant sur elle et neutralisant ainsi la substance nocive du sérum de rat.

Toutefois, en examinant de près ce que devient une culture immunisée émulsionnée dans ce sérum, on constate que la neutralisation de la substance nocive n'empêche nullement la bactériolyse. La quantité absolue de microbes immunisés digérés dans le sérum, n'est pas inférieure à celle de microbes neufs placés dans les mêmes conditions.

Seulement, tandis que ces derniers seront complètement dissous sans donner de cultures filles, les microbes immunisés donneront des cultures nouvelles avant d'être digérés.

Il faut en conclure nécessairement que le mucilage sécrété par le microbe immunisé ne neutralise pas la diastase digestive, mais une autre substance qui gène la nutrition des microbes, et ne joue qu'un rôle indirect dans la bactériolyse.

Les travaux d'Emmerich et Loew, de Gamaleïa, sur l'autodigestion de certains microbes, ainsi que les travaux de notre collègue Malfitano sur la diastase protéolytique sécrétée par la bactéridie charbonneuse, nous ont conduit à penser que dans le phénomène de digestion de la bactéridie charbonneuse dans le sérum de rat, la diastase digestive est fournie exclusivement par le microbe lui-même, et que par conséquent la substance nocive contenue dans le sérum de rat ne serait qu'une sorte d'antiseptique qui, en se fixant sur le corps du microbe, paralyse ses fonctions d'assimilation et de croissance.

L'expérience a pleinement confirmé cette hypothèse, en montrant que les bactéridies tuées par la chaleur ou par un acide ne sont plus digérées dans le sérum de rat, que ce sérum chauffé à 55-58° pendant trois heures n'empêche pas la bactériolyse, et que la bactéridie sera digérée toujours, dans tous les milieux neutres, si par un moyen quelconque on parvient à paralyser ses fonctions de nutrition et de croissance sans la tuer.

L'expérience montre, en outre, que la composition du milieu n'est pas indifférente à l'action de la bactériolyse, que les conditions « optima » pour l'autodigestion se trouvent réalisées dans le sérum de rat ; viennent ensuite, dans l'ordre décroissant, le bouillon de viande peptonisé, l'eau distillée et l'eau physiologique.

Inversement, la bactéridie donnera des cultures dans tous les milieux, même les plus pauvres, comme l'eau distillée ou l'eau physiologique, à la condition que ces milieux ne contiennent aucun antiseptique paralysant ses fonctions de nutrition. En se digérant elles-mêmes, les bactéridies produisent des subtances assimilables dont se nourriront les microbes survivants, qui, dès le moment où ils commenceront à assimiler, résisteront plus longtemps à l'autodigestion, et donneront des cultures d'autant plus abondantes que la quantité de microbes digérés (et par conséquent de substances assimilables) aura été plus grande.

Chaque moment de l'évolution de la bactéridie charbonneuse est donc déterminé par le rapport (a/d) entre les deux fonctions d'assimilation (a) et d'autodigestion (d), fonctions contraires dans leurs effets quand on les considère séparément, mais qui ne sont nullement antagonistes, en ce sens que la diastase bactériolytique sécrétée par le microbe est en même

temps protéolytique. Elle prépare des substances assimilables pour le microbe et constitue ainsi une des conditions de sa croissance.

Le rapport *a/d* change à chaque moment de la vie des bactéridies dans le même milieu, et il est très variable dans des milieux de compositions différentes, parce que la puissance de *a* et de *d* ne dépend pas seulement de la quantité de diastase protéolytique et de substances nutritives, mais aussi de la présence dans ces milieux de substances plus ou moins favorables à l'une ou à l'autre, ou favorable à l'une et en même temps défavorable à l'autre de ces deux fonctions.

Quelques exemples nous permettront de préciser dans quelques cas les valeurs de *a* et de *d*.

En ensemençant une quantité de microbes suffisante pour une observation commode dans un bouillon encore acide pour la phtaléïne, et déjà alcalin pour le tournesol, et en examinant l'état de la culture pendant 48 heures, toutes les 10 minutes pendant la première heure, toutes les 30 minutes pendant les 5 heures suivantes, et toutes les 4 heures ensuite, on remarque, en comptant les microbes détruits et les microbes nouvellement formés, que la bactériolyse commence 20 minutes après l'ensemencement, qu'elle augmente rapidement jusqu'à la 5e heure, et qu'elle diminue ensuite progressivement ; la croissance ne commence qu'à la 10e heure et augmente ensuite progressivement jusqu'à son maximum qui est atteint en 36 à 48 heures.

En ensemençant la même culture dans une série de bouillons contenant, à partir d'un point le plus voisin de la neutralité, d'une part, des quantités croissantes d'acide sulfurique, d'autre part des quantités croissantes de potasse, on trouve : dans la série de bouillons encore alcalins pour la phtaléine, des conditions optima pour la bactériolyse, et peu favorables pour la croissance, dans un des bouillons neutres ou très légèrement acides pour la phtaléïne, des conditions « optima » pour la croissance et peu favorables pour la bactériolyse.

Les valeurs du rapport *a/d* seraient dans ces différents milieux, aux différents moments de la culture, les suivants :

	B. alcalin.	B. neutre.	B. légér.. acide.
1 jusqu'à 20 minutes.	1/1	1/1	1/1
2 après 30 —	1/5	1/4	1/2
3 — 40 —	1/6	1/5	1/2
4 — 50 —	1/8	1/6	1/3
5 — 60 —	1/10	1/7	1/3
6 — 1 h. 1/2.	1/15	1/8	1/4
7 — 2 heures.	1/20	1/9	1/4
8 — 3 —	1/20	1/10	1/5
9 — 4 —	1/20	1/15	1/5
10 — 5 —	1/20	1/15	1/5
11 — 10 —	1/15	2/10	2/4
12 — 12 —	1/10	4/5	3/3
13 — 16 —	1/5	10/3	5/1
14 — 20 —	2/3	15/1	10/1
15 — 24 —	5/1	18/1	15/1
16 — 36 —	10/1	20/1	15/1

En examinant la réaction d'un bouillon primitivement neutre aux différents moments de l'évolution de la bactéridie, on remarque qu'au bout de 36 heures déjà il devient légèrement acide, et que cette acidité augmente aussi longtemps que la culture se développe : or comme la bactériolyse ne peut se faire que dans un milieu neutre ou légèrement alcalin, c'est précisément par cette formation d'acide que le microbe se défend contre l'autodigestion dans un milieu nutritif normal. — Une proportion un peu plus forte d'acide arrête aussi la croissance de la bactéridie, et alors une culture asporogène sera définitivement tuée dans un à deux mois, sans être digérée, tandis qu'une culture sporogène formera des spores qui résisteront pendant des années.

Si maintenant, on examine la bactériolyse seule dans une série de milieux de réaction identique et plus ou moins riches en albuminoïdes et en sels, tels que sérum, bouillon peptonisé. eau physiologique et eau distillée, tous additionnés de chloroforme pour paralyser la croissance des microbes, on constate que la bactériolyse est la plus rapide et complète dans les sérums, un peu plus faible et lente dans les bouillons, encore plus lente dans l'eau distillée, et la plus faible dans l'eau salée à 7 1/2 pour mille.

Les sérums, et à un moindre degré aussi les bouillons peptonisés, contiennent donc une substance qui favorise la bactériolyse, et qui, dans le sérum de rat, paralyse en même temps la croissance.

En enlevant au sérum cette substance, soit en la neutralisant

par les produits d'une culture immunisée, soit en l'épuisant par des émulsions de microbes que l'on enlève ensuite par centifugation, on obtient donc à la fois deux effets différents : on augmente la puissance de la croissance et on diminue la puissance de la bactériolyse.

En résumant ces observations, nous sommes donc autorisé à conclure :

1° Que le sérum de rat ne contient aucune diastase bactériolytique, mais seulement une substance analogue à un antiseptique qui se fixe sur la bactéridie, et, d'une part, paralyse ses fonctions d'assimilation et de croissance, d'autre part, favorise la sécrétion et l'action digestive d'une diastase que le microbe sécrète lui-même ;

2° Que le microbe se défend contre l'action de la substance nocive du sérum de rat par la formation d'une gaine mucilagineuse qui fixe cette substance en dehors du corps du microbe ;

3° Que l'immunisation de la bactéridie contre cette substance ne la rend pas individuellement plus résistante à l'autodigestion, mais lui permet simplement de se nourrir et de donner des cultures nouvelles avant qu'elle soit digérée ;

4° Que le sérum de rat débarrassé de son antiseptique constitue un bon milieu de culture, ce qui explique ce fait que, dans certaines conditions, un mélange riche en sérum donnera une culture plus abondante qu'un mélange contenant une proportion de sérum plus faible.

Immunisation de la bactéridie contre l'arsenic.

L'action de l'arsenic sur la bactéridie charbonneuse et son immunisation contre cet antiseptique ont été étudiées par la même méthode que celle qui a servi pour le sérum de rat.

La puissance antiseptique de l'arsenic varie beaucoup suivant la réaction du milieu : très faible en milieu alcalin, elle est relativement forte dans un milieu acide. — L'acidité ou l'alcanité des milieux ne doit pas dépasser, bien entendu, dans un sens ou dans l'autre, les limites de la croissance des microbes.

Nous avons employé, pour toutes les expériences, des solutions d'acide arsénique dans du bouillon, que nous appellerons alcalin quand ils feront virer au rose clair la phtaléine.

La quantité de culture à examiner, ensemencée dans les différents mélanges, était toujours faible : elle ne donnait pas de trouble appréciable au liquide.

Après avoir reconnu que l'arsenic en solution acide avait une puissance antiseptique à peu près dix fois plus forte qu'en solution alcaline, mais que, à cette différence près, l'action des deux solutions est sensiblement la même, nous avons étudié principalement l'action de la solution acide, en ensemençant pour chaque expérience une série de 50 tubes contenant des solutions arsénicales allant de 1/10,000 jusqu'à 1/200.

En opérant dans ces conditions, et en ensemençant une première série de 50 tubes avec une émulsion de premier vaccin (culture de 24 heures sur gélose), on constate, en examinant les tubes après un séjour de 48 heures à l'étuve, que dans les trois premiers tubes (solution de 1/10,000, 1/7.000, 1/5,000) la culture est notablement moins abondante que dans le tube témoin. Les tubes 4, 5, 6 et 7 (solution de 1/3.333 à 1/1,430) donnent une culture beaucoup plus abondante que le témoin, les tubes 8 à 20 (1/1,250 à 1/500) restent limpides : dans les tubes suivants, on trouve un dépôt de plus en plus abondant.

En ensemençant quelques gouttes du contenu de ces tubes sur gélose, on constate que les tubes 10 à 20 ne donnent pas de culture du tout, ou quelques rares colonies, mais que les tubes 20 à 25 donnent de nouveau des cultures abondantes; ce n'est qu'à partir du tube 26 que l'ensemencement sur gélose reste stérile.

L'examen microscopique du contenu des tubes montre alors que, dans les nos 10 à 20, les microbes ont été complètement dissous, qu'ils n'ont été ni dissous ni tués dans les nos 21 à 25, et qu'ils ont été coagulés dans les tubes suivants.

Il est évident et facile à vérifier que, dans les tubes 10 à 20, les microbes n'ont pas été dissous par l'arsenic, mais qu'il y a là un phénomène d'autodigestion comme dans le sérum de rat, et que dans les tubes 20 à 25 ils sont paralysés dans toutes leurs fonctions. Un séjour plus long dans ces solutions finit quelquefois par amener le développement d'une culture maigre dans les tubes 20 et 21, et une coagulation totale dans les autres.

On voit donc qu'à la dose de 1/5,000, l'arsenic *excite la croissance* du microbe ; à la dose 1/1,000, il *paralyse la croissance* et

excite l'autodigestion ; à 1/500 il *paralyse* les deux fonctions sans tuer le microbe, et enfin qu'à partir de 1/400 il le *tue* en le coagulant.

En habituant la bactéridie, par réensemencements successifs, à des solutions de plus en plus concentrées d'arsenic, on fait déplacer progressivement ces différents « optima » de gauche à droite. On arrive assez facilement à quintupler la concentration de la dose « optima ». Pendant que dans la série témoin, on obtient la culture la plus abondante dans la solution au 1/5.000, la culture traitée poussera le mieux dans la solution au 1/1,000 ; mais il est à noter que les autres « optima » ne seront pas exactement proportionnels au premier. La limite droite de l'autodigestion ne dépassera guère la solution au 1/400, et celle de la coagulation commencera déjà à 1/300.

Une culture accoutumée à l'arsenic prend sur gélose un aspect caractéristique qu'elle garde très longtemps malgré les réensemencements répétés. — Elle forme à la surface de la gélose une couche épaisse d'un mucilage qui, dans les tubes placés verticalement, coule au fond des tubes et finit par y former un culot de 1 à 2 centimètres de hauteur. Elle ressemble à une abondante culture de bactéroïdes ou de *bacillus megatherium* sur un milieu sucré.

L'aspect microscopique d'une telle culture n'est pas moins particulier et caractéristique. Quand on en émulsionne avec précaution un peu dans l'eau, on trouve dans de gros manchons de mucilage soit des bactéridies isolées et droites, soit des filaments contournés en vrilles et formant de petits ressorts à boudin de 3 à 6 tours, comme si cette gaine mucilagineuse se développait plus lentement que le corps du microbe, et, trop difficile à percer, s'opposait mécaniquement au libre développement du filament et l'obligeait à se pelotonner sur lui-même.

La défense de la bactéridie contre le sérum de rat, comme celle contre l'arsenic, présente donc beaucoup d'analogie avec le phénomène observé par M. Metchnikoff dans l'évolution de la tuberculose chez les gerbilles (*Meriones*). Dans ce cas, en effet, le bacille tuberculeux se défend contre l'action nocive des éléments de la cellule géante par une hypertrophie considérable de sa membrane d'enveloppe.

Quand on filtre une telle culture sur une bougie en porcelaine, et quand on ajoute quelques gouttes de ce bouillon à une série de tubes contenant les mêmes solutions arsénicales que celles que nous avons employées précédemment, et qu'on ensemence ces tubes avec une culture non accoutumée, on constate que ce bouillon filtré empêche l'action de l'arsenic proportionnellement à la quantité employée.

Ce bouillon contient donc un « anticorps » qui *fixe* une certaine quantité d'arsenic et forme avec lui un composé inactif.

Le mécanisme de l'action de l'acide arsénique sur les bactéridies, ainsi que le mécanisme de l'accoutumance de ces dernières à cet antiseptique, peut alors être expliqué de la façon suivante :

L'acide arsénique est capable de coaguler ou transformer en acide-albumine tous les albuminoïdes dont est composé le microbe, et de former avec ces substances des composés neutres[1].

En faisant agir sur la même quantité de microbes une série de solutions de plus en plus concentrées, on obtient donc une série de coagulations qui commence par les albuminoïdes les plus facilement coagulables et se termine par la coagulation totale et complète du protoplasma de la cellule.

Il n'est guère possible de déterminer chimiquement quelle est la quantité et la nature des albuminoïdes coagulés par chaque dose d'arsenic, et quels sont les effets biologiques produits par chacun de ces stades de coagulation. Nous avons pu constater, toutefois, qu'une coagulation partielle de la mucine qui entoure la bactéridie et forme probablement aussi le stroma de la cellule *favorise* la multiplication du microbe, qu'une coagulation plus profonde *arrête* sa croissance sans le tuer, et provoque alors sa dissolution par autodigestion, et qu'enfin, une coagulation totale *tue* le microbe et le *fixe* dans un état qui ne varie plus.

Les deux réactions extrêmes, « l'optimum » de croissance et

1. Il ne peut s'agir là, bien entendu, que d'une neutralité relative. L'acide arsénique, combiné à des albuminoïdes, perd son action pathogène spécifique, mais le composé ainsi formé reste dans le milieu et modifie les conditions dans lesquelles le microbe continue à évoluer : il ne peut donc pas être considéré comme complètement inactif.

« l'optimum » de fixation peuvent être reliées par une série ininterrompue de réactions intermédiaires, qui correspondent à une série de coagulations de plus en plus profondes et complètes, et si les phénomènes biologiques correspondant à ces réactions chimiques de même ordre qui se suivent régulièrement ne suivent pas, eux aussi, une ascension régulière et ne sont pas de même nature, c'est uniquement parce que les symptômes appréciables ne sont pas le résultat de l'action directe de l'arsenic, mais d'une réaction secondaire de la cellule. — En coagulant une quantité plus ou moins grande de protoplasma, l'arsenic paralyse chaque fois d'autres fonctions normales de la cellule, et provoque ainsi des ruptures d'équilibre qui se traduisent, dans chaque cas particulier, par des symptômes différents.

Pour expliquer le mécanisme de l'immunisation, nous n'avons à nous occuper que de la première de ces réactions, que l'on peut appeler *réaction immunisante*. Nous avons vu qu'une *dose immunisante* d'acide arsénique coagule partiellement la substance mucilagineuse de la cellule, et qu'il en résulte une multiplication plus active des bactéridies que dans les cultures témoins. — Nous avons constaté, ensuite, qu'en cultivant la bactéridie dans une série de solutions arsénicales de plus en plus concentrées, on obtient des cultures dont chaque microbe devient individuellement plus riche (intérieurement et extérieurement) en substance mucilagineuse, et que les *doses immunisantes* d'arsenic augmentent proportionnellement à la quantité de cette substance, ce qui revient à dire que, pour obtenir toujours la même réaction immunisante, il faut coaguler et neutraliser par l'acide arsénique non pas toujours la même quantité de mucilage, mais une quantité proportionnelle à celle qu'en contient la cellule.

S'il est donc vrai que les mêmes phénomènes biologiques sont produits par des réactions de même nature, il faut admettre nécessairement que, dans le cas particulier qui nous occupe, c'est toujours la même substance, le même mucilage qui fixe les doses immunisantes d'arsenic, et que, si une bactéridie immunisée montre les mêmes symptômes sous l'action d'une dose plus forte d'arsenic qu'une bactéridie non accoutumée, c'est uniquement parce que la première est plus riche en mucine que la seconde.

L'accoutumance des bactéridies à l'acide arsénique, obtenue par une série de cultures dans des *solutions arsénicales immunisantes*, consisterait donc dans une sur production dela substance la plus facilement coagulable, qui forme avec cet antiseptique un composé spécifiquement non pathogène, sinon complètement inactif. — Cette substance mucilagineuse remplit et entoure les microbes cultivés sur des milieux solides : elle se dissout partiellement dans le bouillon ou l'eau physiologique. Dans ce dernier cas elle peut être séparée du microbe par centrifugation ou par filtration, et elle neutralise alors l'acide arsénique dans les mêmes conditions qu'une antitoxine neutralise *in vitro* sa toxine.

Nous voyons donc qu'il y a une grande analogie entre le mécanisme de l'action de l'acide arsénique et de celle du sérum de rat, et que le mécanisme de l'immunisation est identique dans les deux cas. De l'ensemble de ces observations nous pouvons donc conclure :

1° Que la digestion de la bactéridie dans le sérum du rat se produit par un phénomène de même nature que sa digestion dans une solution convenable d'arsenic, et notamment que, dans l'un comme dans l'autre cas, c'est l'arrêt des fonctions d'assimilation et de croissance, dû à l'action coagulante d'un antiseptique, et l'exagération relative des fonctions de désassimilation qui en résulte, qui conduit à une autodigestion, ou autrement dit à une dissolution du microbe par une diastase qu'il sécrète lui-même, et dont l'action devient pathogène parce qu'elle n'est pas tenue en équilibre ou suffisamment compensée par une nutrition convenable ;

2° Que les bactéridies cultivées dans les solutions immunisantes de ces antiseptiques s'efforcent de revenir à un état d'équilibre normal par la surproduction d'une substance qui fixe cet antiseptique et forme avec lui un composé neutre ;

3° Que l'*anticorps* ainsi formé ne peut avoir, par conséquent, aucune action directe sur la diastase sécrétée par le microbe, et ne peut pas arrêter l'évolution des symptômes pathogènes, dès qu'une certaine quantité de cette diastase, mise en liberté par l'action de l'antiseptique, aura commencé à agir pour son compte.

Il n'est guère possible d'admettre que la cellule puisse produire un *anticorps* pour la diastase protéolytique qu'elle sécrète, et qui la digère dans certaines conditions anormales, un *anticorps* capable de neutraliser cette diastase de la même façon et par le même mécanisme que celui qui neutralise un antiseptique. Nous avons vu plus haut que la bactéridie se défend contre cette diastase en modifiant la réaction de son milieu de culture qui, de neutre ou légèrement alcalin, devient légèrement acide et arrête alors la bactériolyse; mais il est évident que cette action de milieu ne peut pas être assimilée à celle d'une antitoxine.

La production de la diastase protéolytique doit être considérée comme une des fonctions normales nécessaire à la vie de la bactéridie; la neutralisation de cette diastase serait donc aussi funeste pour la cellule que sa surproduction, la substance qui la neutraliserait agirait nécessairement aussi comme un antiseptique.

Enfin, il nous semble intéressant à noter que ces recherches, entreprises dans le but de simplifier l'étude du mécanisme de l'immunisation, en prenant comme sujet à immuniser un organisme unicellulaire facile à cultiver, nous ont permis de mettre en évidence :

1° Que l'action diastasique et les symptômes pathogènes appréciables que l'on observe à la suite de l'action des alexines, et probablement aussi des lysines et des toxines, sur des organismes ou des tissus vivants, peuvent être produits par une substance sécrétée par les cellules atteintes, et que, par conséquent, les antitoxines spécifiques n'auront aucune influence directe, dans ces cas, sur cette substance et les symptômes qu'elle fait apparaître;

2° Que si dans l'action des alexines, lysines ou toxines, il y a le plus souvent une action diastasique, il ne s'ensuit pas nécessairement que ces substances soient des diastases ou qu'elles en contiennent.

LE MÉCANISME DE LA GLOBULOLYSE

PAR M. LE Dr P. NOLF

(Travail du laboratoire de Physiologie de l'Université de Liége.)

Dans une précédente revue (1), j'ai eu l'occasion d'exposer les résultats principaux auxquels ont abouti les physiologistes qui se sont occupés de l'action sur les globules rouges d'un grand nombre de produits chimiques. Dans la plupart de ces travaux, il n'est pas question à proprement parler d'hémolyse, mais les questions traitées sont tellement connexes, que les faits observés et les principes qui en découlent nous permettent de nous rendre compte par déduction du mécanisme de ce phénomène.

Il y a lieu de faire une première division des corps chimiques, au point de vue de leur action sur les hématies, en deux catégories : les substances non pénétrantes et les substances pénétrantes. Seules ces dernières nous intéressent directement, puisque ce sont elles dont les solutions peuvent produire la globulolyse. Mais d'après les remarquables recherches de Hedin (2), une nouvelle séparation s'impose parmi elles. Dans un premier groupe se rangeront les substances qui agissent sur les hématies à la manière de l'urée, dans le second celles dont l'action est analogue à celle du chlorure ammonique.

Les représentants du premier groupe se caractérisent comme suit : leurs solutions exercent sur le sang une action identique à celle d'un même volume d'eau distillée. Il suffit, pour les neutraliser complètement, de leur ajouter la dose isotonique d'une substance non pénétrante, le chlorure sodique par exemple. Dans une telle solution, les hématies ont exactement le même volume que dans le même liquide salin privé de l'agent hémolytique.

Au contraire, les solutions de chlorure ammonique exercent une action plus meurtrière que l'eau distillée. Le chlorure

sodique n'arrive pas à les rendre complètement inoffensives. Dans une solution isotonique de ce sel, contenant de faibles quantités de chlorure ammonique, les globules rouges augmentent de volume. Il ne faudrait cependant pas attacher trop d'importance à cette division. Ainsi que l'indiquent les résultats de Hedin, il existe un certain nombre de substances, telles que l'alcool, l'éther, l'acétone, qui agissent, à concentration faible, comme l'urée, et se comportent comme le chlorure ammonique, si l'on enrichit leurs solutions.

On a pu croire qu'aux agents hémolytiques du premier groupe seuls s'appliquent rigoureusement les lois de l'osmose, les globules se détruisant dans leurs solutions comme dans le même volume d'eau distillée. Et l'opinion a prévalu en physiologie que c'est en quelque sorte à un éclatement, à une fissuration du globule, qu'il faut attribuer dans ces cas la diffusion de son contenu.

J'ai émis l'hypothèse que, pour ce qui concerne les agents du second groupe, il faut attribuer à une transformation des propriétés de perméabilité de l'enveloppe globulaire, opérée par eux, l'exception apparente qu'ils font aux lois strictes de l'osmose.

A bien considérer le fond des choses, la même explication pourrait s'étendre également à la globulolyse opérée par les agents hémolytiques du premier groupe. Envisagée de cette manière, la diffusion de l'hémoglobine, opérée par l'eau distillée, ne serait plus la conséquence d'un éclatement du globule, mais d'une perméabilisation de sa paroi à l'hémoglobine. Sous l'action d'une dilution progressive du sérum qui les baigne, les globules gonflent. Et l'on attribue cette dilatation à une pénétration de l'eau extérieure à l'intérieur des hématies, dont le suc cellulaire se trouve ainsi dilué. Mais cette hydratation ne porte pas seulement sur le suc cellulaire, elle atteint également l'enveloppe du globule, le stroma. Pour s'en convaincre, il suffit de s'adresser à des globules d'oiseaux, dont le stroma nucléé est beaucoup plus important, vis-à-vis de la masse cellulaire totale, que celui des mammifères.

Si l'on ajoute à des globules d'oiseau quatre à cinq volumes d'eau distillée, de manière à provoquer une hémolyse totale, et si l'on soumet le liquide à l'action de la force centrifuge, on

obtient, malgré une action prolongée de celle-ci, un résidu globulaire volumineux, formant une masse visqueuse, qui occupe le 1/3 ou le 1/2 de la hauteur totale de la colonne liquide. De sorte que, après cette dissociation opérée par l'eau distilllée des deux constituants des globules, le contenu et les enveloppes, ces dernières occupent néanmoins un volume encore très considérable. Ajoute-t-on maintenant du sel marin à ce liquide, jusqu'à concurence de 1 0/0, et le soumet-on derechef à l'action de la force centrifuge, on assiste à un véritable évanouissement des stromas, qui ne forment bientôt plus. dans le fond du tube, qu'un culot mince, de volume notablement inférieur à celui qu'occupaient les globules intacts dans une solution de même valeur osmotique. Tant consistance que volume du *stroma* sont donc directement et fortement influencés par la valeur osmotique du liquide qui les baigne. Il en est de même, suivant toute probabilité, pour l'état de perméabilité de cette enveloppe vis-à-vis des divers constituants dissous dans le suc cellulaire, notamment de l'hémoglobine. L'enveloppe globulaire est donc en compétition continuelle avec les éléments en solution dans les milieux intérieur et extérieur pour l'eau qui les dissout et qui l'imbibe. Affinité de solution pour ceux-là, affinité d'imbibition pour celle-ci, phénomènes de même ordre, entre lesquels se rangent des intermédiaires.

Dans le sang normal, il existe un état d'équilibre, correspondant à un volume globulaire déterminé, entre trois systèmes de forces attractives de l'eau du sang : *a*) les constituants solubles du sérum ; *b*) les stromas globulaires ; *c*) les substances en solution dans le suc cellulaire des hématies.

Dans les conditions normales, le système *b* est imperméable aux deux autres qu'il sépare. Toute diminution de l'eau dans l'un des trois, amène immédiatement un nouvel équilibre, qui se caractérise par une déshydratation correspondante des deux autres. Toute adjonction d'eau opère le phénomène inverse. Dès que le nouvel équilibre est établi, la mesure de la force attractive pour l'eau, de chacun des systèmes, peut servir de mesure aux autres, puisqu'il y a égalité des trois valeurs. Or, en ce qui concerne *a*, cette valeur nous est précisément donnée par la tension osmotique, facile à mesurer, de ce liquide.

Si la dilution du milieu extérieur dépasse une certaine

mesure, c'est-à-dire si la force attractive de ses constituants tombe en dessous de celle d'une concentration d'environ 0,45 % de sel marin en ce qui concerne le sang de poule, il y a diffusion légère de l'hémoglobine des globules, ce qui, dans l'hypothèse mécanique de la globulolyse, serait dû à une déchirure partielle des globules, provenant de ce que les forces élastiques de leur enveloppe ont été légèrement dépassées. Dans notre hypothèse au contraire, cette limite correspond à une imbibition de la paroi telle, que celle-ci cesse d'être imperméable à l'hémoglobine.

Dans les liquides qui ne contiennent en solution que des substances non-pénétrantes, il faut de toute force l'adjonction d'eau pure en grande quantité pour amener ce degré d'hydratation de la paroi. Il n'en est plus de même quand on emploie des agents globulolytiques du second ordre. A du sang défibriné ajoutons du chlorure ammonique dissous dans une solution isotonique de chlorure de sodium. Le sel ammonique se répartit immédiatement entre globules et sérum. La paroi globulaire, imprégnée de ce sel, possède actuellement une affinité plus grande pour l'eau. Elle en enlève une certaine quantité aux liquides extérieur et intérieur, c'est-à-dire que *dans un milieu isotonique*, elle arrive à un degré d'hydratation, qu'elle ne pouvait atteindre, sans l'adjonction du chlorure ammonique, que par une forte dilution du milieu. Cette hydratation du stroma globulaire en solution isotonique nous est précisément indiquée par le gonflement qu'y montrent les globules (Hedin), gonflement qui différerait de celui opéré par l'eau pure, en ce qu'il intéresse les stromas seuls, tandis que le second est une valeur additive, égale à la somme de l'augmentation de volume des stromas et de celle du liquide intra-globulaire. En d'autres termes, l'hydratation, dans le premier cas, intéresse le système *b* seul, dans le second, *b* et *c*.

Ce gonflement de l'hématie, dans la solution de chlorure ammonique, est comparable à celui des disques de gélatine que Hofmeister plongeait dans des solutions salines, après les avoir imbibés au maximum d'eau distillée. Il y a cependant une différence.

Tandis que dans l'expérience de Hofmeister, les disques sont perméables aux sels du milieu ambiant dont ils s'imprègnent,

augmentant ainsi leur capacité de saturation pour l'eau, dans notre cas, l'imprégnation est exclusivement limitée à l'un des éléments dissous, au chlorure ammonique. Dans le premier cas, la seule force qui s'oppose à une expansion infinie du disque de gélatine dans le milieu salin, c'est la cohésion du disque, c'est-à-dire les forces attractives qui unissent ses molécules ou ses micelles. Dans le second, outre cette force en existe une autre, beaucoup plus importante, l'action antagoniste des sels non-pénétrants, dissous dans le milieu extérieur. Ceux-ci s'opposent à toute hydratation exagérée du stroma, bien avant que les forces de cohésion puissent entrer en jeu.

La division en deux catégories des agents globulolytiques pourrait donc se faire sur la base suivante :

Les premiers (l'urée, l'alcool, l'éther, etc., en faible concentration) n'augmentent pas l'affinité du stroma pour l'eau.

Les seconds (le chlorure d'ammonium; l'alcool, l'éther en concentration forte) augmentent l'avidité du stroma pour l'eau, au point de pouvoir amener en solution isotonique une hydratation du stroma correspondant à celle qu'opère la dilution du sang dans un égal volume d'eau distillée.

Examinons de plus près l'action d'un représentant des deux groupes.

Une série de 20 petits tubes, contenant 1 c.c. d'une dilution au 1/10e de sang défibriné de lapin dans une solution à 0,9 0/0 de chlorure sodique, sont soumis à l'action de la force centrifuge, de façon à tasser les globules dans le fond des tubes. On divise ceux-ci en deux lots et l'on ajoute au premier lot des doses croissantes d'eau distillée 0,50, 0,55, 0,60, 0,65 c.c. etc. en ayant soin d'agiter chaque tube immédiatement après, de façon à produire un mélange rapide de l'eau et du sel. Pour l'autre série, on fait de même avec une solution d'urée à 1 0/0. Au bout de quelques minutes, on soumet le tout à l'action de la force centrifuge, et l'on détermine dans quels tubes s'est opérée l'hémolyse. Dans la série qui a reçu l'eau pure, le début d'hémolyse est obtenu par l'addition de 0,95 c.c. de ce liquide. Ce qui signifie, dans notre hypothèse, que dans une solution de NaCl à $\frac{0,9}{1,95} = 0,46$ 0/0, le stroma est imbibé d'eau à un degré tel, qu'il cesse d'être imperméable à l'hémoglobine.

Dans la série des tubes additionnés de la solution d'urée, la limite est exactement la même. De sorte que la solution d'urée a agi identiquement comme l'eau pure. Le résultat est le même, si au lieu d'une solution d'urée à 1 0/0, on en emploie une à 10 0/0. Cependant dans ce dernier cas, le tube ayant reçu 0,90 c.c. et même celui auquel on a ajouté 0,85 c.c. de solution d'urée, peuvent présenter une légère teinte jaunâtre, indiquant un début d'altération globulaire. Et si l'on place les tubes à l'étuve, concurremment avec la série traitée par l'eau distillée, on peut constater après 2 heures que les différences s'accentuent. Tandis que la série à l'eau pure n'a pas varié, dans l'autre il s'est produit une accentuation de la teinte des tubes qui ont reçu 0,85 et 0,90 c.c. de solution d'urée. De sorte que si la différence d'action est minime et pratiquement négligeable, elle existe cependant.

Une autre façon de la mettre en évidence, c'est de comparer l'action de solutions d'urée de diverses concentrations, faites au moyen d'une solution de chlorure sodique à 10 0/0, à celle de cette même solution privée d'urée. Comme chacun le sait, celle-ci conserve parfaitement pendant plusieurs heures les globules du sang des différents mammifères sans leur causer de préjudice appréciable.

Il n'en est pas de même pour des solutions plus concentrées, de 15, 20, 30 0/0, dans lesquelles les hématies se détruisent rapidement.

Si donc dans du chlorure sodique à 10 0/0, on dissout de l'urée à concurrence de 0,625 , 1,25 , 2,5 , 5 , 10 0/0, on observe que ces différentes solutions dissolvent tous les globules qu'on leur ajoute. Si, au lieu d'une solution de chlorure sodique à 10 0/0, on en emploie une à 5 0/0, on ne lui confère aucune propriété hémolytique par l'addition d'urée. L'urée abaisse donc la limite nocive du chlorure sodique. *A priori*, on peut se demander s'il ne s'agit pas ici d'un effet direct de l'urée sur l'état de dissociation électrolytique du chlorure sodique. Mais cela est assez peu probable, étant donné que des quantités aussi faibles que 0, 625 0/0 d'urée dans NaCl à 10 0/0 produisent déjà la diffusion de l'hémoglobine, alors que d'après les travaux d'Arrhenius, elles ne peuvent pas avoir d'action sensible sur la dissociation du NaCl. Il est plus probable que l'urée produit son effet défavorable en augmentant légèrement la per-

méabilité du stroma pour le chlorure sodique en solution concentrée, partant pour l'eau.

Il n'est donc pas possible de parler d'une façon absolue de substances dont la pénétration dans la paroi globulaire ne change en aucune manière la perméabilité de celle-ci. Hedin avait montré que l'éther, l'alcool, l'acétone, inoffensives à doses faibles, le devenaient à doses fortes. Pour l'urée aussi, c'est affaire de doses et de conditions d'expérience.

Si donc on peut admettre pratiquement une division des substances pénétrantes en substances nocives et substances inactives, il est bon de faire cette réserve que, si petite que soit la modification apportée par le corps pénétrant, elle n'en existe pas moins, même dans le cas des substances qui paraissent le moins actives. Entre elles et les vrais poisons existent toutes les transitions.

Examinons maintenant l'effet de solutions diversement concentrées de chlorure ammonique.

Au même sang de lapin dilué au 1/10e dans une solution de chlorure sodique à 1 0/0, ajoutons des doses croissantes d'une solution à 0,625 0/0 de chlorure ammonique.

L'action destructive de ce sel demandant pour s'accomplir un temps plus long que celle de l'urée ou de l'eau, qui est instantanée, laissons les tubes pendant 2 heures dans une étuve à 37°. Après ce séjour, centrifugeons et déterminons la limite de globulolyse. Celle-ci est atteinte par l'adjonction de 0,60 c. c. de notre solution. Pour des concentrations de 1,25, 2,50, 5 et 10 0/0, elle tombera graduellement à 0,5, 0,4, 0,35 et 0,20 c. c.

En fait, ces volumes moindres de chlorure ammonique correspondent à des poids plus considérables de ce sel : la quantité absolue ajoutée dans la première série étant de 0,00375 grammes et, respectivement, de 0,00625, 0,010, 0,0175 et 0,02 grammes de AmCl dans les suivantes. De sorte que l'imprégnation des globules va croissant d'une série à l'autre. On comprend dès lors que, si l'imbibition du stroma globulaire par le chlorure ammonique augmente l'affinité de ce stroma pour l'eau, cette affinité ira croissant de la première série à la dernière. Elle augmentera detelle façon que, dans la première série, elle sera assez forte pour enlever à une solution de chlorure sodique de

$\frac{1}{1,6} = 0,635$ 0/0 la même quantité d'eau que le stroma normal n'enlève qu'à la solution de 0,46 0/0. Et dans les 2e, 3e, 4e et 5e séries, elle arrivera à des valeurs correspondant à des teneurs en NaCl de $\frac{1}{1,5} = 0,66$ 0/0, $\frac{1}{1,4} = 0,71$ 0/0, $\frac{1}{1,35} = 0,74$ 0/0, $\frac{1}{1,2} = 0,83$ 0/0.

Entre les globules imprégnés de chlorure ammonique et le milieu extérieur, existe donc une compétition pour la possession de l'eau, tout comme elle existait dans le cas des globules normaux. Mais l'avantage, dans cette lutte, se dessine progressivement au profit des stromas, à mesure de leur imprégnation croissante par le sel ammonique.

Mais si, au lieu d'avantager la paroi globulaire, nous agissons en sens inverse, c'est-à-dire si nous augmentons l'affinité du milieu extérieur pour l'eau, ce qui s'obtient aisément en lui ajoutant du sel marin, il faudra, si notre hypothèse se vérifie, que nous arrivions à neutraliser l'action des solutions concentrées de chlorure ammonique. C'est ce que l'expérience confirme d'une façon absolue.

Dans une série de petits tubes, on introduit 1 c. c. de solutions progressivement croissantes de chlorure sodique (solutions 0,1 N[1], 0,2 N, 0,3 N, etc.). A tous, on ajoute 0,5 c. c. d'une solution de chlorure ammonique à 10 0/0, puis 0,1 c. c. de sang défibriné de lapin. Après deux heures, il y a hémolyse dans les 3 premiers tubes, tandis que dans l'échantillon contenant la solution 0,4 N, il n'existe pas de traces de diffusion. Ce qui veut dire qu'une concentration de $\frac{0,585 \times 4}{1,5} = 1,62$ 0/0 de chlorure sodique suffit pour s'opposer à l'action hydratante d'une solution contenant $\frac{0,5 \times 10}{1,5} = 3,3$ 0/0 de chlorure ammonique. Dans l'expérience précédente, nous avions constaté qu'une concentration de 0,83 0/0 de chlorure sodique équivalait à une teneur en chlorure ammonique de $\frac{0,02 \times 100}{1,2} = 1,66$ 0/0.

1. Par le signe N, j'entends désigner dans l'exposé de ces résultats une solution contenant, dans un litre de liquide, un poids de matière dissoute, correspondant au poids moléculaire de cette matière exprimé en grammes.

Il ne faudrait pas pousser trop loin ces concentrations croissantes, ni donner aux chiffres une valeur trop absolue. La conservation plus ou moins prolongée des globules, même à la température de 0°, amène de légères différences dans les résultats.

D'autre part, les sels alcalins n'agissent plus, comme il a été dit plus haut, en solution concentrée, de la même manière que dans des solutions dont la teneur ne dépasse pas notablement celle des liquides organiques. Ce qu'il était important de faire ressortir, c'est l'influence antagoniste des sels pénétrants et non-pénétrants, constatation qui, d'après les chiffres cités, se poursuit régulièrement dans des limites très larges.

Au lieu de chlorure sodique, on peut employer, à l'effet de neutraliser l'action du chlorure d'ammonium, d'autres substances qui ne pénètrent pas la paroi globulaire. Et pour rendre les résultats comparables, il y a lieu d'employer de celles-ci des solutions équi-moléculaires. Si l'on voulait opérer les comparaisons d'une façon absolument rigoureuse, il faudrait en outre tenir compte pour chacune d'elles de son coefficient isotonique établi par de Vries ou Hamburger. N'ayant pas eu en vue de déterminer des valeurs absolues, j'ai négligé d'opérer cette dernière correction, qu'il serait d'ailleurs loisible de faire *a posteriori*, si l'intérêt s'en faisait sentir.

Avec les doses citées plus haut et le même échantillon de sang, j'ai obtenu pour le nitrate potassique, la neutralisation de l'influence du chlorure ammonique, pour une teneur de KNO_3, correspondant à une concentration 0,3 N. Dans une solution de saccharose 0,1 N, il y avait une très légère globulolyse, n'existant plus dans les solutions 0,2 N, et 0,3 N, mais réapparaissant et augmentant dans les concentrations 0,4 N, et 0,5 N, fait très intéressant, sur lequel j'aurai l'occasion de revenir.

Les sels des métaux alcalino-terreux s'opposaient à l'action du chlorure ammonique, même dans leurs solutions 0,1 N. Il est malheureusement difficile d'élucider la signification de cette action immunisante remarquable, étant donnée l'ignorance, où nous a laissés Hedin, de ce qui touche le degré de perméabilité du stroma globulaire des mammifères aux sels de ces métaux.

Le tableau suivant met en regard ces différents résultats :

Dans chaque tube :

1 c.c. de solution saline, 0,5 c.c. de chlorure ammonique à 10 %, 0,1 c.c. de sang défibriné de lapin.

2 heures d'étuve à 37°.

TITRE DES SOLUTIONS	NaCl	KNO_3	$BaCl_2$	$Ca(C_2O_2H_3)_2$	$MgSO_4$	$C_{12}H_{22}O_{11}$
0.5 N	rien	rien			rien	glob. faible
0.4 N	rien	rien	rien	rien	rien	gl. tr. faible
0.3 N	glob. faible	rien	rien	rien	rien	rien
0.2 N	glob. faible	glob. modérée	rien	rien	rien	rien
0.1 N	glob. forte	glob. forte	rien	rien	rien	gl. tr. faible

On pourrait objecter à ces essais, l'action réciproque du chlorure ammonique sur les sels dout l'ion électro-négatif est différent de Cl, aboutissant à la transformation partielle du chlorure ammonique en un autre sel d'ammonium. Cette double décomposition ne pouvait avoir de conséquences très marquées que pour le sulfate magnésique, dont l'ion électro-négatif ne pénètre pas les globules rouges. Si j'ai néanmoins cité les résultats obtenus avec ce sel, c'est avant tout pour permettre leur confrontation ultérieure avec ceux obtenus dans des expériences, où l'agent hémolytique employé est autre que le chlorure ammonique.

Il n'a été question jusqu'ici de l'hémolyse qu'au point de vue des conditions qui règlent le début du phénomène, c'est-à-dire la diffusion de l'hémoglobine, le stroma restant comme résidu. Or cet état ne correspond, pour un grand nombre d'agents d'hémolyse, qu'à un commencement d'action, celle-ci pouvant se transformer ultérieurement en une dissolution totale de tous les constituants de l'hématie. En opérant cette dissolution, les agents hémolytiques vont plus loin que l'eau pure, qui, elle, ne parvient à opérer que le premier terme du phénomène. Il a été dit plus haut que la force qui s'oppose dans ces conditions à la dissolution totale, c'est l'attraction des molécules du stroma entre elles, plus forte que celle de ces mêmes molécules pour l'eau qui les entoure. Or, si l'on admet que l'imbibition du

stroma par les agents hémolytiques a pour conséquence d'augmenter son affinité pour l'eau, il devient très compréhensible que, pour une teneur donnée du liquide en substance hémolytique, l'affinité des molécules du stroma pour l'eau soit augmentée au point de les détacher de leurs congénères, ce qui amènera la dissolution du complexe.

A ce point de vue, il est très intéressant d'étudier l'action de la bile, à raison de la grande puissance hémolytique de ce liquide. Si l'on ajoute de la bile de bœuf par doses croissantes à du sang de lapin dilué au 1/10, on peut obtenir tous les degrés du phénomène : débutant par la diffusion légère, incomplète ; se poursuivant dans la diffusion intégrale avec résidu de stromas encore compact ; puis éclaircissement de ce dernier, qui devient léger, floconneux et finit par disparaître.

Comme on le sait, l'action hémolytique de la bile dépend des sels de sodium des acides biliaires. C'est un fait assez étrange à première vue que cette globulolyse si intense sous l'influence des sels de sodium. En effet, les auteurs qui ont étudié les rapports de sels des métaux alcalins fixes avec les globules rouges, ont été unanimes à déclarer la paroi globulaire impénétrable ou très peu pénétrable pour eux, fait qu'ils attribuaient aux propriétés non-pénétrantes des ions K et Na·. D'après cette hypothèse, qui s'accorde d'ailleurs bien avec la plupart des faits connus, l'action des solutions de sels biliaires devrait être rapportée, non aux ions provenant de la dissociation électrolytique des sels biliaires, mais aux molécules neutres, non dissociées, pour lesquelles les propriétés de l'ion Na· n'interviennent pas. Si j'attire l'attention sur cette apparente exception aux observations de Gryns, Hedin, Koeppe, c'est que, étudiant l'influence qu'exercent les solutions salines sur la globulolyse opérée par la bile, je suis arrivé à des résultats assez imprévus, dont la compréhension pourrait être facilitée par les considérations précitées.

Ayant ajouté des globules de sang de lapin, de chien, de cheval à des solutions 0,1 N., 0.2 N., 0.3 N., etc. de NaCl, puis ayant déterminé la quantité de bile qu'il fallait ajouter à ces différents liquides pour provoquer un début d'hémolyse, je trouvai que plus la concentration saline est forte, moins il faut de bile : résultat absolument opposé à ce que j'avais constaté lors de l'étude des propriétés dissolvantes du chlorure ammo-

nique. Le résultat était tout aussi net, si, au lieu de NaCl, j'employais du KNO_3. Il devenait d'une intensité frappante dans des solutions de chlorure de baryum, acétate de calcium, sulfate de magnésium. Au contraire, il n'existait qu'à l'état d'ébauche dans des solutions de saccharose.

Dans le tableau suivant sont figurés les résultats d'une expérience.

Dans chaque tube :

2,5 c.c. de solution saline, 0,05 c.c. de bile de bœuf, 0.25 c.c. de sang de lapin. 2 heures à la température ordinaire.

TITRE DES SOLUTIONS	NaCl	KNO_3	$BaCl_2$	$Ca(C_2O_2H_3)_2$	$MgSO_4$	$C_{12}H_{22}O_{11}$
0.5 N	Globulolyse forte, tardive, avec résidu	Globulolyse forte, tardive, avec résidu		Dissolution un peu tardive, sans résidu.	Dissolution immédiate et complète sans résidu	Traces de globulolyse.
0.4 N	—	—	Dissolution immédiate et complète sans résidu	—	—	Rien
0.3 N	—	—	—	—	—	—
0.2 N	Traces de globulolyse.	Globulolyse forte.	Dissolution un peu retardée. Pas de résidu.	—	Dissolution un peu retardée. Pas de résidu.	—
0.1 N	Rien	Rien	—	Résidu faible	—	—

Il ressort de l'expérience trois constatations importantes :

1° A égalité de concentration moléculaire, l'hémolyse par la bile se fait beaucoup plus facilement dans les solutions des sels des métaux alcalino-terreux que dans celles des métaux alcalins ;

2° La dissolution pour toutes les liqueurs salines est d'autant plus facile que la concentration est plus forte ;

3° Les solutions sucrées se comportent comme les solutions salines, mais avec une intensité d'action incomparablement plus faible.

Il faut ajouter les observations suivantes. Ayant déterminé la limite de globulolyse dans une émulsion de globules de

lapin, faite dans une solution de NaCl à 0,9 0/0 et dans une autre émulsion de même valeur où le liquide était une solution sucrée isotonique, j'ai trouvé que l'action de la bile était un peu plus intense dans l'émulsion sucrée. Donc, à titre isotonique, le sucre ne protège pas les globules contre l'action de la bile. D'autre part, ayant ajouté à du sang, dilué dans de l'eau salée à 0,9 0/0, le maximum de bile qu'elle pût contenir, sans qu'il y eût de globulolyse, ayant centrifugé, lavé les globules une fois et les ayant placés dans une solution de chlorure barytique de concentration 0,3 N, je n'ai pas observé la moindre altération globulaire. Ceci exclut toute action détériorante séparée des sels biliaires et des sels barytiques sur les globules.

Il faut donc admettre plutôt une action directe des sels minéraux et organiques sur les sels biliaires, au moment même où ceux-ci agissent.

Or, on sait en chimie que : 1° l'adjonction, à une solution d'un sel dissocié, d'une substance également dissociée, ayant un ion commun avec le sel, produit une diminution de la dissociation de celui-ci;

2° D'une façon générale, les sels des métaux alcalino-terreux sont dissociés à un degré moindre que les sels correspondants des métaux alcalins;

3° Les non-électrolytes (sucre) ajoutés en forte quantité (la solution 0,5 N de sucre contient 17, 0/0 de cette substance) à une solution d'un élément dissocié diminuent généralement la dissociation de celui-ci.

L'application de ces principes à l'explication des observations tendrait donc à faire comprendre l'action favorisante de ces différents agents sur l'hémolyse par les sels biliaires dans le sens indiqué plus haut. Ils augmenteraient le nombre des molécules neutres aux dépens des molécules dissociées ; molécules neutres qui, d'après les travaux des physiologistes, pourraient seules pénétrer, quand l'élément métallique qu'elle contiennent est alcalin (fixe) ou alcalino-terreux.

De sorte que, si notre interprétation des phénomènes est exacte, on pourra dire qu'ici encore, comme ce fut le cas pour toutes les exceptions apparentes à la théorie osmotique, les faits à première vue les plus inconciliables avec cette théorie finissent cependant par y trouver leur place et leur signification.

Après cet examen du mécanisme de la globulolyse par les agents de nature chimique bien déterminée, il est intéressant d'étudier par les mêmes méthodes et avec les connaissances acquises jusqu'ici, si la dissolution globulaire opérée par les alexines est attribuable à des causes analogues.

GLOBULOLYSE PAR LES SÉRUMS.

A. Sérums hémolytiques normaux.

Buchner, qui a étudié le premier avec soin les propriétés bactéricides et globulicides des sérums, reconnaît qu'il faut les attribuer à des substances qu'une température de 55° détruit facilement et qui ne diffusent pas au travers du parchemin. Il montre en outre, en ce qui concerne les bactériolysines, que leur action ne se développe qu'en un milieu suffisamment riche en sels. Ce sont là les principaux caractères de ces corps mystérieux, auxquels il donna le nom d'*alexines*.

Pour expliquer cette action nocive qu'opèrent les alexines, tant sur les cellules rouges que sur les germes microbiens, Buchner admet qu'elles sont de nature enzymatique. Pour lui les alexines sont des enzymes protéolytiques, qui exercent une action dissolvante sur certains éléments structurés, dont les matériaux constituants sont des albuminoïdes. Buchner admet aussi que les alexines protéolytiques sont d'origine leucocytaire.

Ces idées du savant de Munich obtinrent un grand succès dans le monde des bactériologistes. Elles permettaient de rattacher les qualités microbicides des sérums à la grande théorie de la phagocytose, et il sembla tout naturel que les phagocytes, ces cellules spécialement vouées à la digestion de tous les déchets organiques et des corps étrangers qui pénètrent dans les tissus, pussent laisser échapper dans le sérum une partie des ferments digestifs dont on les suppose doués.

Cependant avant d'admettre par analogie ces hypothèses, si séduisantes qu'elles puissent être, il est prudent d'examiner si

les conditions du phénomène répondent bien à leurs exigences, et si d'autre part d'autres considérations ne rendent pas aussi bien compte des faits. La grande multiplicité de ces alexines, le fait qu'elles diffèrent d'un animal à l'autre, comme le montrent de récentes recherches de Bordet (4); que, d'autre part, leur action est ordinairement très limitée, se produisant sur telles hématies à l'exclusion d'autres; tous ces motifs réunis détachent l'esprit d'une conception enzymatique de ces substances. Les ferments solubles connus ne présentent jamais une spécialisation d'action aussi marquée, et on ne les trouve pas non plus en une abondance aussi inquiétante.

D'autre part, comme je l'ai fait ressortir dans un précédent article, toute action fermentative se caractérise par ses produits. Quels sont ceux de l'action de l'alexine sur les globules? De l'hémoglobine et un stroma, c'est-à-dire deux substances qui étaient déjà libres de toute union entre elles à l'intérieur du globule, et dont la séparation est de nature purement physique, sans qu'il y intervienne la moindre hydrolyse chimique.

A la vérité, le stroma peut être ultérieurement dissous, si la quantité de sérum actif est suffisante. Mais tous les agents hémolytiques chimiques, l'urée comprise, opèrent cette dissolution. Et certains, comme la bile, se montrent aussi actifs à cet égard que les sérums les plus meurtriers. Cet acte de dissolution, considéré en lui-même, ne signifie donc rien, et il n'acquerrait quelque signification, au point de vue de la thèse de Buchner, que s'il s'accompagnait d'une peptonisation de ce stroma. C'est ce que personne n'a vérifié jusqu'ici, à ma connaissance.

L'observation est facile à faire. Voici comment j'ai opéré :

On recueille aseptiquement le sérum du caillot d'un animal, le chien par exemple, dont le sérum est actif vis-à-vis des globules d'un autre animal (le lapin), dont on recueille et défibrine également aseptiquement le sang. Puis on mélange les deux liquides dans la proportion de une partie du sang pour 10 parties de sérum. Dans ce rapport, la globulolyse est totale.

Dans certains cas, le mélange a été introduit en tubes scellés, dans d'autres, dans des tubes ou ballons bouchés simplement par un tampon de ouate. Les mélanges furent conservés à l'étuve 37° pendant 24 ou 48 heures, 8 ou 15 jours. Avant d'examiner

leur contenu on s'assure de leur stérilité. Dans les différents récipients, le globulolyse se fait rapidement, et si l'on agite fréquemment le mélange, on arrive à provoquer une dissolution presque complète des stromas.

Si le liquide n'a été conservé que 1 ou 2 jours à l'étuve, il est rouge sombre, sa coloration étant due à un mélange d'hémoglobines réduite et oxygénée. Si la conservation a été longue, la coloration devient brunâtre (même en tube scellé, moins cependant) et l'on peut constater au spectroscope que ce changement de teinte est due à une transformation de la matière colorante du sang en methémoglobine (methémoglobine que l'on peut aisément retransformer en hémoglobine réduite par la putréfaction à l'abri de l'air). Cette transformation est partielle dans les tubes scellés, et il est probable qu'elle s'y limite. Dans les tubes communiquant avec l'air extérieur, elle se propage de la surface vers la profondeur, ce qui indique qu'elle se fait sous l'influence de l'air extérieur et non de substances contenues dans le sérum.

Or, cette methémoglobinisation est la seule transformation que subit l'hémoglobine dans le sérum actif. Et pourtant l'hémoglobine est une substance albuminoïde que l'on devrait s'attendre à voir attaquer par un ferment protéolytique. Il n'y a pas de trace d'une telle action. C'est ce qu'on constate facilement sur des sérums d'animaux variés, conservés aseptiquement depuis des mois, et, qui lors de leur obtention, se teintent quelquefois légèrement par un peu de matière colorante du sang. Ces sérums brunissent à la longue mais ne se décolorent pas, et spectroscopiquement, on y retrouve habituellement un mélange d'oxyhémoglobine et de methémoglobine.

Une première constatation, c'est donc que *les alexines ne digèrent pas l'hémoglobine*. Peptonisent-elles les stromas? Pour élucider ce point, j'ajoute au liquide sanglant 4 fois son volume de solution physiologique, et assez d'acide acétique pour avoir une très légère réaction acide au tournesol, puis je chauffe le mélange à 110° à l'autoclave, en arrêtant la chauffe dès que cette température est atteinte [1]. Après refroidissement, on filtre

1. Quand il s'agit de liquide fortement albumineux, la température du bain-marie est souvent insuffisante pour amener une coagulation totale des albuminoïdes coagulables. Il faut éviter d'autre part une chauffe trop longue à l'autoclave, qui pourrait amener par elle-même un début de peptonisation.

et on examine par les méthodes habituelles si le filtrat donne les réactions des substances protéiques. Or je dirai de suite qu'il n'en contient pas ou tout au plus des traces tellement minimes que le mélange avec plusieurs volumes d'alcool absolu ne donne qu'une opalescence à peine visible, et qu'au polarimètre, au tube de 10 centimètres, il n'y a pas de déviation constatable. D'ailleurs on trouve ces traces également après la coagulation d'un sérum inactivé par chauffage à 56° et additionné de globules, malgré qu'il n'y ait pas eu la moindre globulolyse. Elles proviennent probablement d'un déficit (extrêmement réduit) lors de la coagulation.

On est donc en droit de conclure, de façon certaine, que *les alexines ne déploient pas la moindre activité peptonisante vis-à-vis des albuminoïdes du globule.*

Il était peut-être superflu d'étudier également à ce point de vue un sérum actif, c'est-à-dire provenant d'un animal traité par des injections de sang étranger. J'ai néanmoins fait cet examen en employant des mélanges de sang de lapin et de sérum de cobaye. vacciné au moyen de sang de lapin. On peut employer ici des mélanges beaucoup plus riches en globules. Les doses employées étaient également suffisantes pour produire une dissolution globulaire complète ou presque complète. Encore ici, le résultat fut complètement négatif.

En présence de ces constatations, il est clair qu'il faut rejeter toute explication enzymatique de l'action globulicide des alexines. Dès lors, il est plus indiqué que jamais de comparer leur action à celle des agents chimiques d'hémolyse.

Et l'un des meilleurs moyens à cet effet, c'est d'étudier l'action des sels métalliques en concentrations croissantes. Mes observations ont porté sur l'action du chlorure sodique, iodure potassique, nitrate potassique, chlorure barytique, acétate calcique, sulfate magnésique et saccharose.

Les sérums examinés furent ceux de bœuf, de chien et de lapin dans leur action sur du sang de lapin, de cheval, de bœuf, de poule. Habituellement. au lieu de sang j'employai des émulsions globulaires, de façon à éliminer les albuminoïdes du sérum. Voici quelques tableaux d'expérience.

I

Dans chaque tube :

1 c.c. de solution, 1 c.c. de sérum de chien, 0,2 c.c. d'une émulsion de globules de coq. — 1 heure à 37°.

TITRE DES SOLUTIONS	$NaCl$	KI	KNO_3	$BaCl_2$ *
0.8 N	rien			
0.7 N	—			
0.6 N	traces			
0.5 N	globulolyse faible	rien	rien	
0.4 N	globul. moyenne	—	traces	rien
0.3 N	—	traces de glob.	glob. faible	—
0.2 N	globulol. intense	glob. faible	globul. forte	—
0.1 N	—	globul. forte	—	—

II

Dans chaque tube :

5 c.c. de solution saline, 1 c.c. de sérum de chien, 0,5 c.c. de bouillie globulaire lavée de cheval. — 2 heures 1/2 à 37°.

TITRE DES SOLUTIONS	$NaCl$	KNO_3	$BaCl_2$
0.5 N	globul. faible	rien	
0.4 N	globul. forte	—	rien
0.3 N	—	globul. forte	—
0.2 N	—	—	—
0.1 N	—	—	—

* En ce qui concerne la chlorure de baryum, il est bon de ne pas dépasser des concentrations de 0,4 N, parce que ce sel à plus fortes doses agit par lui-même d'une façon novice sur les globules, si le contact est prolongé.

III

Dans chaque tube :

1 c.c. de solution saline, 0,25 c.c. sérum lapin, 0,10 c.c. émulsion de globules de cheval. — 2 heures à 37°.

TITRE DES SOLUTIONS	NaCl	KNO^3	$BaCl_2$
0.5 N	rien	rien	
0.4 N	globul. forte	—	rien
0.3 N	—	globul. forte	—
0.2 N	—	—	—
0.1 N	—		—

IV

Dans chaque tube :

1 c.c. de solution saline, 0,3 c.c. sérum de chien, 0,1 c.c. émulsion de globules de bœuf. — 2 heures à 37°.

TITRE DES SOLUTIONS	NaCl	KNO_3	$BaCl_2$
0.5 N	rien	rien	»
0.4 N	—	—	rien
0.3 N	—	—	—
0.2 N	glob. faible	—	—
0.1 N	globul. forte	globul. forte	—

V

Dans chaque tube :

1 c.c. solution saline, 0,2 c.c. sérum de chien, 0,1 c.c. émulsion de globules de cheval. — 1 heure 1/2 à 37°.

TITRE DES SOLUTIONS	NaCl	KNO_3	$BaCl_2$	$Ca(C_2O_2H_2)_2$	$MgSO^4$	Saccharose
0.5	rien	rien	»	rien	rien	Globulolyse forte
0.4	glob. faible	rien	rien	—	—	—
0.3	glob. forte	traces	—	-	—	—
0.2	—	glob. forte	-	—	—	—
0.1	-	—	—	—	—	—

VI

Chaque tube contient :

1 c.c. de liquide, 0,2 c.c. de sérum de bœuf, 0,1 c.c. sang de chien. — 2 heures à 37°.

TITRE DES SOLUTIONS	NaCl	KNO^3	$BaCl_2$	$Ca(C_2O_2H_3)_2$	$MgSO^4$	Saccharose.
0.5 N	glob. faible	glob. faible		rien	rien	Glob. forte dans les 5 tubes; le résidu globulaire allant diminuant à mesure que la concentration augmente.
0.4 N	traces	glob. forte	rien	—	—	
0.3 N	—	—	—	—	—	
0.2 N	—	dis. compl.	—	—	—	
0.1 N	rien	—	—	—	—	

De l'examen de ces protocoles d'expériences, faites avec des sérums et des globules d'origines diverses, ressortent des constatations d'ordre général :

1° Les sels des métaux alcalins (fixes) s'opposent à la globulolyse par les sérums actifs d'autant plus qu'ils sont plus concentrés ;

2° De façon générale, le nitrate potassique est plus actif que le chlorure sodique. Il n'y a d'exception que dans l'expérience relatée au tableau VI, et chose remarquable, les concentrations fortes de chlorure sodique agissent dans ce dernier cas inversement à la loi générale ;

3° Les sels des métaux alcalino-terreux s'opposent en toute concentration à l'action des alexines ;

4° Le saccharose agit dans certains cas (Exp. VI.) en favorisant la globulolyse pour une plus forte concentration. Dans d'autres cas (Exp. V.), les différences de concentration n'ont pas d'influence marquée.

Si l'on rapproche ces résultats de ceux qui ont été obtenus au moyen du chlorure ammonique, on est étonné de leur grande ressemblance, presque de leur identité. L'action du saccharose, des sels des métaux alcalins est la même, la propriété neutralisante si énergique des sels des métaux alcalino-terreux est tout aussi prononcée.

On est donc bien en droit de vouloir rapporter cette ressemblance frappante de l'action antagoniste des sels vis-à-vis des deux genres d'hémolyse, à une identité dans l'essence de ces phénomènes. *Les alexines agiraient donc comme le chlorure ammonique et probablement tous les agents globulolytiques chimiques, en augmentant d'une façon notable l'affinité pour l'eau, de la paroi globulaire qu'elles imprègnent.*

Des partisans tenaces d'une théorie protéolytique de l'hémolyse par les alexines, pourraient objecter que les études faites sur la fermentation pepsique ont également montré le rôle empêchant que des concentrations fortes de sels alcalins exercent vis-à-vis de celle-ci, et que dès lors les constatations précédentes ne plaident pas contre la nature diastasique des alexines. Il serait plus logique de retourner le rapprochement et de demander si ce n'est pas par un mécanisme analogue à celui que nous avons étudié, que les sels agissent aussi sur les phénomènes de vraie digestion.

On mesure en effet celle-ci par la rapidité que met à se dissoudre un fragment coagulé de blanc d'œuf ou un flocon de fibrine dans un liquide digestif. Or les recherches de Hasebroek (8) pour la fermentation pepsique, de Hermann (9) pour la fermentation trypsique ont démontré que le premier acte de ces phénomènes est une pure *dissolution* des albuminoïdes coagulés, sans transformation chimique. Dès lors il n'est pas étonnant de voir se répéter pour eux ce qui se passe dans l'hémolyse. Et il serait au contraire très intéressant de reprendre leur étude d'après les principes qui ont guidé ces recherches.

On a également avancé en faveur de la nature diastasique des alexines l'influence très marquée de la température sur l'hémolyse qu'elles provoquent. En ce qui concerne l'influence favorisante d'une température de 37°, il y a lieu de faire remarquer qu'elle n'est pas limitée aux alexines, mais s'exerce aussi sur la dissolution globulaire opérée par le chlorure ammonique et probablement aussi par d'autres agents chimiques. Il est clair, d'autre part, que le chauffage à 56° n'arrivera pas à dépouiller ces derniers de leur propriété hémolytique, tandis qu'il enlève toute activité aux alexines. Mais cette constatation ne prouve nullement la nature diastasique de ces substances, puisque le fibrinogène, qui n'est certainement pas une enzyme, est coagulé à cette même température.

Mais, pourrait-on dire, à 0° l'hémolyse par les alexines est totalement supprimée, comme le sont d'ailleurs toutes les fermentations, tandis que rien de pareil n'a été signalé au sujet de l'hémolyse chimique. Cette différence est réelle. J'ai pu voir en effet que la température de la glace fondante ne s'opposait nullement à l'action dissolvante de l'éther, du chloroforme, des acides biliaires, de la glycérine, bref des agents chimiques les plus divers, à pénétration rapide ou lente. Elle n'est cependant pas absolue : il est au moins un agent incontestablement chimique, dont les solutions sont rendues complètement inoffensives par la température de 0°.

Et cet agent c'est le même chlorure ammonique, qui nous a déjà montré tant de ressemblances d'action avec les alexines.

Dans une solution de 10 % de ce sel, refroidie à 0°, versons quelques gouttes de sang de lapin, de chien, de cheval. Si nous retirons les tubes de la glace après 12 ou 24 heures, nous constatons que les globules ont sédimenté dans un liquide incolore tout comme dans du sérum. (Les globules du bœuf semblent y subir une très légère altération.) Il suffit de retirer ces tubes refroidis, de les placer à 37° pour constater au bout de peu de minutes une dissolution totale des hématies.

Au sujet de la nature de cette inactivité, il y a peu de chose à dire ; l'hypothèse la plus vraisemblable, c'est qu'à 0°, il y a impénétrabilité de la paroi globulaire pour les alexines et le chlorure ammonique.

Avant d'avoir reconnu cette intéressante analogie des solu-

tions de ce sel avec les alexines, j'avais pensé qu'il fallait peut-être attribuer l'inaction des sérums à 0° à une diminution de solubilité des alexines à cette température. Comme on le sait par les travaux de Wooldridge (5), le plasma de peptone contient une substance qui joue un rôle dans la coagulation du sang et qui se précipite à 0°. Wright (6) a obtenu le même précipité par le refroidissement du plasma oxalaté de chien, et moi-même j'ai pu constater que du sérum de chien, maintenu longtemps à 0°, se trouble également, avec formation lente de flocons légers qui se redissolvent par l'élévation de température. Dans l'idée de Pekelharing (7), la substance obtenue du plasma serait le *fibrin-ferment*, dont on admet généralement l'origine leucocytaire. C'étaient là des motifs suffisants pour encourager une recherche dans ce sens. Du plasma de chien peptoné ayant été refroidi et le précipité s'étant formé, on divisa le liquide par décantation en deux portions, l'une formant environ les 7/8 du liquide total, absolument limpide, le 1/8 restant contenant la totalité du précipité. Après un court chauffage à 37°, celui-ci se dissolvait presque intégralement. Ayant mesuré alors la valeur hémolytique des deux liquides par la méthode exposée dans un travail précédent, je la trouvai identique. Ce résultat n'a d'intérêt qu'en ce qu'il est une preuve de plus, ajoutée à celles produites déjà par Buchner (3), que fibrin-ferment et alexines sont des substances totalement distinctes.

La conclusion de cette série de recherches peut se résumer ainsi :

Les alexines sont dépourvues de toute action peptonisante sur les albuminoïdes constitutifs des globules rouges.

Elles se caractérisent par leur propriété de pénétrer, d'imbiber la paroi globulaire des hématies de certains animaux, pénétration qui est suspendue à une température de 0°. L'imprégnation du stroma a pour conséquence une augmentation de son affinité pour l'eau, ce qui lui permet d'enlever cette eau même à des solutions isotoniques avec le sérum sanguin. Par suite de l'hydratation élevée de la membrane globulaire, l'hémoglobine parvient à la pénétrer et diffuse à l'extérieur.

Avant de terminer cette étude du mode d'action des alexines, je dirai encore que si l'on étudie la dose minima, qui provoque un début d'hémolyse dans une série de dilutions sanguines, on

obtient invariablement dans les émulsions riches une limite légèrement inférieure à celle des émulsions pauvres.

L'expérience se fait de la façon suivante : On recueille le sérum d'une partie du sang à examiner, qui doit être très frais. Et l'on pratique des dilutions de 1/2, 1/3, 1/5, 1/10, de ce sang dans son sérum. Des volumes égaux de ces émulsions contiennent des masses globulaires qui sont dans le rapport de 2, 3, 5, 10. Si maintenant on répartit ces émulsions dans plusieurs séries de tubes, et qu'on détermine dans chaque série quelle est la quantité minima de sérum actif qu'il faut ajouter à un volume constant de chaque émulsion pour produire un début d'hémolyse, on constate qu'il faut un peu moins de sérum dans les tubes contenant plus de globules que dans les autres. La différence est d'ailleurs extrêmement faible d'une série à l'autre, quelquefois à peine appréciable. Mais quand elle existe, c'est toujours dans le sens indiqué.

J'ai obtenu absolument le même résultat en employant divers agents chimiques, tels que la bile, le chlorure ammonique à 10 0/0, l'éther (ajouté directement au sang après avoir centrifugé celui-ci), l'acétone. C'est une analogie d'action de plus entre les alexines et les agents chimiques de globulolyse.

La constatation a son importance, en ce qu'elle nous montre d'autre part que, sous ce rapport, comme sous beaucoup d'autres, les alexines se différencient complètement des substances actives que l'on produit par la vaccination. Tandis que les antitoxines, les antiferments, les agglutinines spécifiques (10) et probablement aussi les anticorps s'unissent suivant des proportions assez nettement définies avec les éléments qui leur correspondent, de sorte que, plus il y a de cet élément, plus il faut de sérum actif pour arriver à un état déterminé de neutralisation, il n'en est rien pour les alexines.

Toute cette étude s'est rapportée jusqu'ici à l'action des sérums normaux, dont l'activité réside entièrement dans leur teneur en alexines. Peut-on étendre les données acquises dans leur étude aux sérums hémolytiques obtenus par la vaccination ?

B. Sérums hémolytiques obtenus par vaccination.

Il semble que la réponse à cette question peut-être franchement affirmative. Grâce aux belles recherches de Bordet, auquel nous devons la question même des sérums hémolytiques, obtenus par vaccination, ainsi que la presque totalité de nos connaissances à leur sujet, l'étude de leurs constituants actifs est assez avancée pour permettre dès maintenant une idée suffisante de leur mode d'action.

D'après Bordet, un sérum obtenu par injection de sang étranger possède, outre son alexine normale, un élément nouveau spécifique, la sensibilisatrice ou anticorps, créé par la vaccination. C'est à l'action combinée de ces deux éléments qu'est due l'action meurtrière du sérum. L'anticorps renforce dans des proportions notables l'action de l'alexine normale sur les globules du sang qui a servi lors de la vaccination. Cette interprétation des faits a été acceptée et confirmée par tous les auteurs qui se sont occupés de la question après Bordet.

Ehrlich et Morgenroth (11) ont montré ensuite que l'anticorps était réellement fixé sur le globule, cette fixation étant stable, résistant aux lavages ultérieurs du globule. De plus, ces auteurs ont apporté une nouvelle preuve de la dualité des substances actives du sérum en montrant que du sang à 0° fixe seulement l'anticorps et non l'alexine, tandis que la fixation est double à 37°.

Bordet a poussé l'analyse plus loin (4). Étudiant le sérum de cobayes, qui ont reçu du sang de lapin, il a constaté d'abord que la fixation de l'anticorps actif se faisait tout aussi facilement par les stromas globulaires incolores de lapin, que par les globules intacts de cet animal. Et ces stromas ainsi imprégnés, fixaient l'alexine du cobaye, ce qu'ils ne faisaient pas avant. C'est-à-dire que toutes les propriétés des globules se retrouvaient dans leurs stromas. D'autre part, l'injection de ces stromas décolorés à des cobayes rendait leur sérum hémolytique, tandis que l'injection de l'hémoglobine du lapin n'amenait aucun résultat.

J'ai répété ces expériences, et j'ai pu les confirmer dans leurs données essentielles. Seulement, au lieu de me contenter d'une injection, j'en ai fait trois, distancées de huit jours entre elles. A deux cobayes, j'ai injecté les globules de 5 c. c. de

sang de lapin, à deux autres l'hémoglobine de 10 c. c. de sang, et aux deux derniers les stromas blancs des 10 c. c. Un de ces derniers est mort de cause inconnue. Les injections se faisaient pour les six animaux, le même jour, avec le même sang: la saignée fut opérée 8 jours après la dernière vaccination. Les 5 sérums étaient actifs au point de vue hémolytique et agglutinant. Des 5, le plus actif dans son action globulicide était celui de l'animal qui avait reçu les stromas. Puis venaient les sérums des cobayes injectés de globules, et enfin ceux des animaux auxquels avaient été administrée l'hémoglobine.

Bien que le stroma ne constitue qu'une part infime du résidu sec des globules des mammifères, c'était l'injection de ces stromas qui avait donc abouti à donner le sérum le plus actif. Je m'explique le faible degré de propriétés actives chez les cobayes injectés d'hémoglobine, par la dissolution, d'ailleurs constatée depuis longtemps, d'une partie du stroma dans la liqueur rouge; fraction trop faible pour faire sentir son effet après une injection (expérience de Bordet), mais suffisante pour agir quand l'administration en est répétée.

Comme il a été dit plus haut, Bordet avait démontré, d'autre part, qu'au stroma revient également la propriété de fixer l'anticorps. On aurait pu objecter à l'interprétation de cette constatation (que je puis confirmer), que l'état de cohésion, de structure intime du stroma pouvait avoir été modifié de telle manière qu'il se comportait dans cette fixation un peu à la façon de certaines substances telles que la poudre de charbon, sur lesquelles les albuminoïdes ont tendance à se coller.

Pour peu solide que fût l'argument, il était bon de le réfuter, ce qui pouvait se faire facilement par l'étude de la spécificité de ces stromas décolorés. Dans une expérience instituée à cet effet, j'ai fait agir une même quantité de sérum actif d'un de mes cobayes sur: 1° un volume déterminé de globules de lapin; 2° un volume correspondant de stromas de lapin; 3° une émulsion globulaire de sang de poule de même valeur; 4° sur les stromas de poule y correspondant. Après une demi-heure de digestion, les liquides furent séparés des globules. On y introduisit de nouveaux globules de lapin et une quantité suffisante de sérum neuf de cobaye. Il y eut hémolyse dans les deux derniers tubes seulement. Ce résultat confirme donc l'hypothèse de Bordet.

Bordet ayant ainsi démontré les rapports mutuels qui existent entre stroma, anticorps et alexine dans l'acte de l'hémolyse, s'abstient de formuler une théorie définie concernant le mécanisme de leur action. Il semble cependant qu'étant donné l'état de la question et les compléments apportés dans ce mémoire au mode d'action des alexines, il soit permis d'entrevoir la nature du processus.

Si l'on admet comme fondée qu'il existe, entre l'action des alexines et celle des substances chimiques qui produisent la globulolyse, la plus grande ressemblance, et que le fond de ces phénomènes est identique, il y a lieu d'étendre aux alexines les connaissances acquises par les travaux de Hedin sur les poisons chimiques. Or cet auteur nous a montré que pour chaque agent de globulolyse, comme d'ailleurs pour n'importe quelle substance soluble dans l'eau, il existe un coefficient de partage, constant dans des limites de concentration assez étendues, entre le liquide et les hématies. Les substances globulolytiques sont précisément celles qui ont pour le stroma un coefficient élevé. Dès lors il y a lieu d'admettre, sans qu'il soit possible d'en fournir une preuve expérimentale rigoureuse, faute de pouvoir isoler les alexines, que le même principe leur est applicable. Définie de cette manière, une alexine active vis-à-vis d'un sang donné sera une substance albuminoïde dont le partage entre plasma et globules se fera plutôt à l'avantage de ces derniers.

Dans une expérience, j'ai ajouté 1 c. c. de sérum normal de cobaye à 1 c. c. d'une émulsion au 1/10e de sang de lapin. Après deux heures, pas de globulolyse, tout au plus une très légère teinte jaunâtre. J'en conclus que l'alexine du sérum de cobaye n'a pas d'affinité pour les hématies du lapin, qu'elle ne les pénètre que très peu. Le partage entre liquide et globules est tout à l'avantage du liquide.

Dans une autre expérience, je prends 1 c. c. de la même émulsion globulaire, je ne lui ajoute plus que 0,05 c. c. de sérum normal de cobaye, ce qui fait une concentration de l'alexine de ce sérum 10 fois plus faible que dans le premier cas, mais j'ajoute en même temps 0,05 c. c. d'un sérum actif chauffé à 56°. Après deux heures, il y a destruction complète des globules.

De sorte que, malgré une teneur du liquide ambiant dix fois moindre que dans le premier cas en alexine, celle ci est

fixée beaucoup plus énergiquement que précédemment.

Dans mes études sur l'action de l'anticorps produit par le lapin, à la suite de l'injection de sang de poule, j'étais arrivé à des résultats analogues. Ici l'alexine pouvait opérer par elle-même la dissolution des globules de poule. Il suffisait pour cela qu'elle fut en concentration suffisante dans l'émulsion. Si l'on diminuait cette teneur en dessous d'une certaine limite il n'y avait plus d'action. Mais, à ce moment, l'adjonction d'une petite quantité d'anticorps activait le mélange. Cependant j'ai observé lors de ces études, sans faire des mesures très précises à ce sujet,que la concentration de l'alexine ne pouvait pas être abaissée notablement au-dessous de sa limite propre d'action, c'est-à-dire que si la teneur était diminuée au delà d'environ le 1/4 de la concentration encore active (limite d'activité) quand l'alexine agit seule, l'adjonction de l'anticorps perdait son efficacité.

La conclusion de ces expériences s'impose : *l'anticorps doit être considéré comme une substance qui augmente dans des limites plus ou moins étendues le coefficient d'absorption des globules pour les alexines.* En d'autres termes, l'anticorps joue en hémolyse le rôle des mordants en teinture. Fixé sur le globule, il rend celui-ci avide d'alexine, comme le mordant facilite la fixation de la couleur sur la fibre textile. Dès lors, l'alexine, retenue en concentration plus forte dans la trame globulaire, exerce énergiquement sur celle-ci son action habituelle d'hydratation, dont les conséquences, la diffusion de l'hémoglobine ou même la dissolution complète de l'hématie s'établissent naturellement.

Faut-il, pour que l'anticorps puisse opérer ce travail, que le corps cellulaire soit déjà légèrement perméable à l'alexine seule, ou bien la fixation se produit-elle encore, même lorsque l'alexine seule ne pénètre absolument pas?

Y a-t-il d'abord des alexines qui ne pénètrent pas du tout dans les globules? La question est difficile à résoudre. Mais le fait que les globules de tous les animaux se détruisent assez rapidement (après quelques jours) dans leur propre sérum stérile tend à plaider en sens contraire. Cette hémolyse tardive doit probablement être considérée comme étant, du moins partiellement, la conséquence d'une altération des globules. Pour certains sangs cependant, cette explication ne peut suffire.

Ainsi j'ai pu observer régulièrement que le sérum retenu plus d'un jour dans un caillot non rétracté (par suite d'adhérence au tube) de sang de lapin était teinté d'hémoglobine; de même pour le chien. Au contraire, dans les mêmes conditions, le sérum de poule restait clair bien plus longtemps. On serait tenté de conclure que l'alexine du lapin a plus d'affinité pour le globule du lapin que l'alexine de poule pour le globule de poule. Ceci n'est-il pas en rapport avec le fait, constaté par Bordet, que le sérum de lapin peut activer un anticorps dirigé contre le sang de lapin, tandis que le sérum de poule n'a pas d'action sur du sang sensibilisé de poule?

Une raison qui tend à faire croire que l'anticorps n'arrive à fixer en grande quantité sur des globules qu'une alexine qui les pénètre déjà légèrement quand elle agit seule, c'est l'action du froid. A 0°, chlorure ammonique et alexines ne pénètrent pas dans les globules. Si au lieu de globules intacts, on en prend qui ont été sensibilisés, c'est-à-dire qui fixent l'alexine avec une affinité 10 fois plus forte (et davantage), et qu'on les place à 0° dans des liquides très riches en alexine, il n'y aura néanmoins pas trace d'hémolyse. *Ce qui prouve que l'alexine n'arrive pas à imbiber un stroma sensibilisé, si elle ne peut pas non plus imprégner légèrement le globule normal.*

Ce mordançage spécial des globules par les anticorps permet, comme Bordet l'a montré, leur imprégnation par un grand nombre d'alexines d'origine différente. Mais cependant, c'est l'alexine de l'animal qui a fourni l'anticorps, qui est fixée avec le plus d'avidité. Constatation qui plaide encore en faveur de notre manière de voir. Suivant celle-ci, les forces qui poussent les alexines dans les globules sont des forces du même ordre que celles qui amènent le sucre à se dissoudre dans l'eau ou le colorant à teindre le tissu. On conçoit que des albuminoïdes provenant d'un même sérum aient entre elles plus d'affinité de ce genre que si elles sont empruntées à des animaux différents. Et ainsi se fera que l'imprégnation des globules de lapin par un anticorps provenant d'un cobaye favorisera davantage la pénétration ultérieure de l'alexine du même animal.

Cette action sensibilisante si spéciale se limite d'ailleurs aux alexines. J'ai vainement essayé, au moyen d'anticorps, d'accroître la sensibilité des globules vis-à-vis de la bile ou même du chlo-

rure ammonique, dont l'action est cependant si rapprochée de celle des alexines.

La seule différence, en dehors de l'action des alexines, que j'ai pu constater entre globules normaux et globules sensibilisés de poule, c'est que, tandis que les premiers tiennent encore leur hémoglobine dans des solutions à 0,45 0/0 de NaCl, les derniers teintent souvent d'un peu d'hémoglobine les solutions de 0,55 0/0 et même plus concentrées. Mais c'est là un caractère nullement spécifique, et qui semble ne pouvoir être d'aucun secours dans la compréhension des phénomènes.

Conclusions : 1° La globulolyse par les agents chimiques est due à leur propriété d'augmenter l'affinité de l'enveloppe globulaire pour l'eau. Cette hydratation excessive amène une transformation des conditions de perméabilité de l'hématie, qui permet la diffusion de l'hémoglobine au dehors ;

2° Les alexines ne sont pas des ferments protéolytiques. Elles agissent à la façon des agents chimiques d'hémolyse ;

3° Les anticorps favorisent l'action des alexines en les fixant en plus grande abondance sur le corps cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. P. Nolf, *Annales de l'Institut Pasteur*, juillet 1900.
2. Hedin, *Pflüger's Archiv. für die gesammte Physiologie*. Bd. 68.
3. Buchner, *Centralblatt für Bakteriologie und Parasiten kunde*. Bd. V et VI. — *Archiv. für Hygiene*. Bd. X. — *Münchener med. Wochenschrift*, 1900.
4. Bordet, *Annales de l'Institut Pasteur*, numéro de mai 1900.
5. Wooldridge, *Chemistry of the Blood*.
6. Wright, *The Lancet*, 1892.
7. Pekelharing, *Onderzoekingen gedaan in het Physiologisch Laboratorium der Utrechtsche Hoogeschool. Vierde Reeks*.
8. Hasebrock, *Zeitschrift für physiologische Chemie*. Bd. XI.
9. Herrmann, *Zeitschrift für physiologische Chemie*. Bd. XI.
10. P. Nolf, *Annales de l'Institut Pasteur*, mai 1900.
11. Ehrlich et Morgenroth, *Berl. klin. Woch*. 1899, pp. 6 et 481. 1900.

SÉRUMS NÉVROTOXIQUES

Par C. DELEZENNE

(Travail du laboratoire de physiologie de l'Université de Montpellier.)

On sait depuis longtemps que le sérum sanguin d'une espèce animale quelconque possède la propriété de dissoudre avec plus ou moins de rapidité les globules rouges d'individus d'espèce différente.

Les recherches de ces dernières années ont montré que cette propriété n'est, en somme, qu'un cas particulier de l'action nocive exercée par les humeurs sur les éléments cellulaires qui leur sont normalement étrangers.

Le pouvoir que possède le sérum sanguin normal de détruire les bactéries, les spores, les hématies ou les leucocytes, la cellule nerveuse ou la cellule hépatique, n'est que la manifestation d'une véritable fonction de défense, commune à tous les animaux, s'exerçant toujours par les mêmes procédés.

Les travaux des microbiologistes nous ont appris, d'autre part, qu'il est possible d'augmenter le pouvoir bactéricide des humeurs pour un microorganisme déterminé : il suffit pour cela d'injecter à un animal des doses répétées et progressivement croissantes des produits bactériens correspondants.

On aurait pu penser que cette capacité de l'organisme, d'augmenter sa fonction de défense vis-à-vis de certains éléments cellulaires étrangers, se limitait à ceux dont il est accidentellement l'hôte et contre lesquels il doit constamment lutter, c'est-à-dire aux microorganismes.

Des données récentes du plus haut intérêt ont montré que ce processus est beaucoup plus général, et que les animaux ont la faculté de produire, lorsqu'ils y sont incités, des sérums fortement toxiques pour toute sorte d'éléments cellulaires.

M. Bordet[1] a constaté le premier qu'il suffit d'injecter à un animal des globules rouges d'une espèce étrangère pour obtenir un sérum capable d'agglutiner et de dissoudre avec une très grande intensité les hématies correspondantes. Il a montré, en outre, qu'il y a une complète analogie entre la propriété bactéricide et le pouvoir hémolytique ou hémotoxique du sérum des animaux préparés. Dans les deux cas, le sérum agit grâce au concours simultané de deux substances, dont l'une (alexine) existe aussi bien chez l'animal neuf que chez l'animal préparé, dont l'autre au contraire (substance sensibilisatrice) est propre au sérum des sujets traités et constitue à proprement parler l'« anticorps » spécifique.

Ces résultats ont été confirmés par MM. Dungern[2], Landsteiner[3], Erhlich et Morgenroth[4], etc. Ces derniers, dans plusieurs mémoires très remarquables sur les hémolysines, ont apporté en outre une série de faits des plus intéressants sur le mécanisme intime de leur action.

A la suite de la découverte de Bordet, nombre d'expérimentateurs se sont efforcés d'obtenir par la même méthode des sérums toxiques vis-à-vis d'éléments cellulaires variés. Je rappellerai à ce sujet les recherches de MM. Landsteiner[5], Metchnikoff[6], Moxter[7], sur le sérum spermotoxique; celles de M. Dungern[8] sur le sérum antiépithélial; les travaux de M. Metchnikoff[9] et les nôtres[10] sur le sérum leucotoxique, et ceux de M. Lindeman[11] sur le sérum néphrotoxique.

L'activité de ces divers sérums correspond, comme celles des sérums bactéricides artificiels, à une réaction d'immunisation, et résulte de la formation, par les organismes immunisés, de poisons cellulaires spécifiques auxquels M. Metchnikoff a proposé d'appliquer la dénomination générale de cytotoxines.

1. Bordet, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898 p. 688.
2. Landsteiner, *Centralb. f. Bacteriol.*, 1899
3. Dungern, *Munch. med. Wochens*, 1899.
4. Erhlich et Morgenroth, *Berliner klinische Wochens*, 1899, nos 1 et 22; 1900, no 21.
5. Landsteiner, *Centralb. fur Bacteriologie*, 1899
6. Metchnikoff, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1899.
7. Moxter, *Deutsche medic. Wochens*, 1900.
8. Dungern, *Munch. medic. Wochens*, 1899.
9. Metchnikoff, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1899.
10. Delezenne, *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 2 avril 1900.
11. Lindeman, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1900

Je me suis attaché moi-même depuis près d'un an à l'étude de cette intéressante question, en me plaçant surtout au point de vue de ses applications à la physiologie. J'ai communiqué récemment [1] les résultats que j'ai obtenus dans la préparation d'un sérum toxique pour la cellule hépatique. J'ai réussi également, quoique avec un peu plus de difficulté, à obtenir un sérum spécifique contre la cellule nerveuse. Le présent mémoire a précisément pour but de relater mes recherches dans cette voie.

Des recherches sur le même sujet sont également poursuivies avec succès depuis quelques mois dans le laboratoire de M. Metchnikoff. Ce savant maître a bien voulu répéter devant nous quelques expériences inédites dont les résultats concordent dans leur ensemble avec ceux que nous avons personnellement obtenus. Nous sommes heureux de l'en remercier et de pouvoir lui témoigner toute notre gratitude pour le bienveillant intérêt avec lequel il a suivi nos travaux et pour les encouragements qu'il n'a cessé de nous prodiguer.

I. — Considérations générales sur l'étude des névrotoxines. Névrotoxines des sérums normaux.

J'ai rappelé plus haut que la propriété que possède le sérum sanguin normal de détruire avec plus ou moins d'intensité les globules rouges des animaux d'espèces étrangères ne se limite pas à ces seuls éléments. A des degrés divers, toutes les cellules sont susceptibles d'être détruites, lésées ou troublées dans leur fonctionnement par les cytotoxines des sérums normaux. Mais si l'action de ces dernières est facile à observer lorsqu'il s'agit d'éléments sur lesquels on peut agir aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, les hématies ou les leucocytes par exemple, elle est d'ordinaire bien plus difficile à mettre en évidence lorsqu'on s'adresse aux cellules des tissus ou des organes. Outre que pour celles-ci l'expérience *in vitro* n'est pas réalisable, l'étude *in vivo* présente le plus souvent de sérieuses difficultés.

S'il suffit de recueillir un échantillon de sang et d'en pratiquer un examen sommaire pour se rendre compte des effets hémolytiques provoqués par l'injection d'un sérum étranger, ce n'est

1. Delezenne, *Sérum antihépatique;* XIII[e] Congrès international de médecine Paris, 2-9 août 1900, et *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 11 août 1900.

que par une analyse minutieuse des troubles fonctionnels qu'il a produits et des lésions qu'il a provoquées qu'on sera à même d'affirmer que ce sérum est également toxique pour la cellule nerveuse ou la cellule hépatique, par exemple.

Or, il est nombre de sérums normaux qui, injectés à de certaines doses dans les vaisseaux, n'atteignent pas les éléments nerveux, alors qu'ils détruisent avec plus ou moins d'intensité les hématies et les leucocytes.

Sommes-nous autorisé à en conclure pour cela que ces sérums ne sont pas toxiques pour la cellule nerveuse? Non, assurément. Il n'est pas certain *a priori*, en effet, qu'au point de vue de leur action sur les hématies et la cellule nerveuse, par exemple, les poisons de ces éléments (hémotoxine et névrotoxine) soient placés dans les mêmes conditions d'activité lorsqu'ils sont injectés l'un et l'autre dans le torrent circulatoire, voire même sous la peau ou dans le péritoine. Introduite dans les vaisseaux, l'hémolysine se fixe immédiatement sur les globules rouges, tandis que la névrotoxine entre préalablement en rapport avec des éléments différents de ceux sur lesquels doit s'exercer son action. D'autre part, pour atteindre les centres nerveux, elle doit traverser la barrière endothéliale, qui peut exercer vis-à-vis des organes intéressés un rôle de protection plus ou moins efficace. Il est donc possible qu'un sérum dont l'action nocive sur la cellule nerveuse est nulle ou peu marquée, lorsqu'il est introduit dans l'organisme par la voie veineuse ou sous-cutanée, manifesterait les effets toxiques les plus nets s'il était porté directement au contact de cet élément.

Or d'intéressantes recherches de MM. Roux et Borrel nous ont déjà montré que la toxicité de certains poisons possédant une affinité spéciale pour la cellule nerveuse différait considérablement suivant la voie d'introduction, et que « l'inoculation intra-cérébrale était un excellent moyen de vaincre l'apparente insensibilité des animaux vis-à-vis de l'inoculation sous-cutanée [1] ».

Chez le lapin, par exemple, il est nécessaire d'injecter 2, 5 c. c. de toxine tétanique sous la peau, pour donner un tétanos ordinaire, mortel en 4 jours, tandis qu'il suffit d'injecter 0, 1 c. c. dans le cerveau, c'est-à-dire une dose 25 fois plus faible, pour donner un tétanos cérébral, mortel en 20 heures. D'autre part,

1. Roux et Borrel, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898.

le rat, qui est pour ainsi dire réfractaire à l'inoculation sous-cutanée de la toxine diphtéritique, se montre au contraire très sensible aux effets de ce poison introduit à très faible dose dans les centres nerveux.

Lingelsheim[1], Borrel[2] ont observé des faits du même ordre en étudiant l'action de la tuberculine chez le cobaye. D'après Borrel, on peut souvent injecter sous la peau de cet animal 1 gramme de tuberculine précipitée par l'alcool sans obtenir la mort, alors que par la voie cérébrale 3 à 4 milligrammes suffisent à la produire. Chez le cobaye tuberculeux, qui est beaucoup plus sensible aux effets de la tuberculine, on observe, d'après le même auteur, une effroyable activité du poison lorsqu'il est mis au contact direct des cellules nerveuses; 1/10, 1/100, 1/1000 de milligramme peuvent suffire à provoquer les accidents caractéristiques de l'intoxication des centres nerveux et la mort de l'animal. On peut encore observer des faits analogues en s'adressant aux alcaloïdes : Roux et Borrel ont montré, en particulier, que l'immunité relative du lapin vis-à-vis de la morphine disparaît lorsqu'on introduit cette substance à dose très faible dans le cerveau.

L'innocuité plus ou moins complète de ces divers poisons du système nerveux, lorsqu'ils sont injectés sous la peau, voire même dans le péritoine ou dans les veines, ne peut évidemment s'expliquer que par une action protectrice de l'organisme s'exerçant par des procédés sur lesquels nous sommes encore loin d'être fixés. Cette action protectrice ne présente d'ailleurs pas dans tous les cas la même efficacité. Il suffit de rappeler à ce propos l'exemple de la toxine tétanique qui, chez le cobaye, est tout aussi active en injection sous-cutanée qu'en injection intra-cérébrale, alors que chez le lapin elle présente, comme nous l'avons mentionné plus haut, une toxicité toute différente suivant la voie d'inoculation.

Voyons maintenant si ces données, sur lesquelles nous avons à dessein assez longuement insisté, ne sont pas applicables à l'étude des névrotoxines, et s'il ne peut pas y avoir intérêt, pour mettre nettement en évidence l'action toxique d'un sérum étranger sur les centres nerveux, à s'adresser de préférence à la

1. Lingelsheim, cité par Borrel.
2. Borrel, *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1900, p. 359.

méthode des injections intracérébrales. Pour répondre à cette question, j'ai fait une étude comparative de la toxicité d'une série de sérums normaux, en m'efforçant de déterminer, pour chacun d'eux, quelle est la dose mortelle chez le lapin, d'une part en injection sous-cutanée ou en injection intraveineuse, et d'autre part en injection dans les centres nerveux.

Il m'a paru utile de m'adresser tout d'abord à un sérum dont l'action nocive pour la cellule nerveuse peut déjà être mise en évidence avec facilité, en employant les voies d'introduction habituelles, la peau, le péritoine ou les vaisseaux. Le sérum d'anguille semble convenir tout particulièrement à cette étude préalable.

Ce sérum peut être considéré, en effet, comme le type des sérums cytotoxiques normaux. Il détruit avec la plus grande intensité la plupart des éléments cellulaires des mammifères lorsqu'il est mis directement ou indirectement en contact avec eux. Tel est le cas pour les globules rouges (Camus et Gley [1], Kossel [2]), les leucocytes (Delezenne [3]), la cellule nerveuse (Kossel et Westphal [4]), l'épithélium rénal (Pettit [5]), etc.

Les accidents nerveux provoqués par le sérum d'anguille lorsqu'il est injecté chez le lapin à dose mortelle, sous la peau ou dans les veines, sont des plus caractéristiques. Ils ont déjà été d'ailleurs fort bien décrits par M. Mosso [6], puis par MM. Camus et Gley [7]. Ils sont le plus souvent caractérisés par de la parésie, des mouvements brusques et violents de procursion, par des attaques convulsives plus ou moins généralisées (convulsions cloniques, contractures), par des troubles respiratoires et cardiaques. Dans certains cas, surtout si la dose injectée est élevée, ce sont les phénomènes paralytiques qui dominent pour ainsi dire d'emblée, la phase d'excitation étant réduite au minimum.

Si tous ces accidents sont symptomatiques d'une intoxication profonde des centres bulbo-médullaires, il n'en est pas moins vrai que la mort des animaux n'est pas seulement imputable

1. Camus et Gley, *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1898, p. 428.
2. Kossel, *Berliner Klin. Wochens*, février 1898.
3. Delezenne, *Archives de physiologie*, 1898, p. 508.
4. *Loc. cit.*
5. Pettit, *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1898, p. 320.
6. Mosso, *Archives italiennes de Biologie*, t. X, p. 141.
7. Camus et Gley, *Archives de pharmacodynamie*, 1898, p. 247.

aux lésions du système nerveux; elle est la résultante d'une série d'altérations cellulaires plus ou moins graves, plus ou moins étendues, et dont les troubles nerveux ne sont, en somme, que la manifestation la plus apparente.

J'appelle l'attention sur ce fait, parce que nous aurons à en tenir compte dans l'appréciation des résultats fournis par l'étude comparative de la toxicité du sérum d'anguille en injection intravasculaire ou sous-cutanée, et en injection intracérébrale.

Pour éviter toute cause d'erreur tenant à des variations dans l'activité des sérums employés, je me suis servi dans tous les cas du même sérum. Celui-ci avait une toxicité, pour le lapin, se rapprochant sensiblement de la moyenne. Injecté dans la veine marginale de l'oreille, il tuait les animaux à la dose de 0, 2 c. c. par kilogramme en 5 ou 10 minutes environ; à la dose de 0, 1 c. c. la mort survenait au bout de 1 heure ou 1 heure et demie.

De plus faibles quantités étaient encore assez souvent mortelles, mais, dans ce cas, les animaux succombaient plus tardivement. En injection sous-cutanée, il fallait atteindre 0, 3 c. c. à 0, 4 c. c. par kilogramme pour tuer en une heure environ.

Voyons maintenant comment se comportait le même sérum lorsqu'il était porté directement au contact des centres nerveux. Toutes nos expériences d'injections intracérébrales furent faites en suivant exactement la technique indiquée par Roux et Borrel : le sérum était injecté lentement à travers la fine aiguille d'une seringue de Pravaz; l'aiguille était enfoncée en plein cerveau dans la région frontale, en avant des centres moteurs, par un petit orifice pratiqué à la paroi crânienne au moyen d'un foret. L'orifice était toujours fait, autant que possible, exactement au même niveau, c'est-à-dire à 2 millimètres environ de la suture frontale et un peu en arrière d'une ligne réunissant la commissure postérieure des paupières. Le sérum était dilué dans l'eau salée physiologique, et la dilution, quelle que fût la dose de sérum employée, était toujours calculée de façon que la masse totale du liquide injecté ne dépassât pas 0, 1 c. c. à 0, 2 c. c. par kilogramme. On sait que le lapin supporte aisément, par la voie cérébrale et sans le moindre trouble, une quantité d'eau salée même très notablement supérieure.

Nos premiers essais d'injection intracérébrale nous ont rapide-

ment démontré l'hypertoxicité considérable du sérum d'anguille lorsqu'il est porté directement au contact des centres nerveux.

Il nous a suffi dans tous les cas d'injecter 0, 005 c. c. de sérum par kilogramme pour tuer les animaux en 5 à 10 minutes; avec une dose moitié moindre, c'est-à-dire 0,0025 c. c. les lapins ont succombé une demi-heure ou 1 heure après l'injection, et 0.0015c. c. furent encore, d'ordinaire, très suffisants pour produire la mort en quelques heures. Il a été nécessaire de descendre jusqu'à 1/1000 de centimètre cube pour ne plus obtenir que des accidents passagers, et encore quelques animaux, après s'être remis temporairement, ont-ils succombé au bout de quelques jours.

Ce sérum d'anguille était donc environ 50 fois plus toxique lorsqu'il était introduit directement dans les centres nerveux que lorsqu'il était injecté dans les vaisseaux, et près de 200 fois plus toxique qu'en injection sous-cutanée.

Les accidents nerveux provoqués par le sérum d'anguille, lorsqu'il est inoculé par la voie cérébrale, ne diffèrent pas sensiblement de ceux qui sont observés lorsqu'on emploie la voie veineuse ou sous-cutanée. Le poison diffuse avec une très grande rapidité dans toute l'étendue de l'axe cérébro-spinal et détermine les phénomènes bulbo-médullaires caractéristiques. Ceux-ci, (mouvements de procursion, convulsions, cloniques, contractures, etc.), présentent simplement un degré inaccoutumé d'acuité et de violence.

Ces accidents sont d'ailleurs les seuls observés. Si la dose injectée est suffisante, dans les conditions de l'expérience, pour produire des lésions graves et étendues du système nerveux, elle est naturellement trop faible, en supposant même qu'elle puisse passer en totalité dans les vaisseaux, pour atteindre les hématies, les leucocytes, ou tout autre élément cellulaire.

La mort des animaux est donc exclusivement la conséquence de l'action destructive du sérum d'anguille sur les centres nerveux. En fait, grâce au procédé des injections intracérébrales, nous possédons une méthode qui nous permet d'étudier les propriétés névrotoxiques d'un sérum, indépendamment des autres actions cytolytiques qu'il peut être capable d'exercer.

Je me suis assuré qu'on obtient des résultats du même ordre en s'adressant à d'autres sérums dont la toxicité pour les

mammifères, sans être égale à celle du sérum d'anguille, n'en est pas moins encore très élevée. J'ai expérimenté à cet égard, et avec le même succès, le sérum de la grenouille, celui de la couleuvre, de la tortue, etc. Le sérum de grenouille, pour ne citer qu'un exemple, tue le lapin en quelques minutes lorsqu'il est introduit dans le cerveau à la dose de 0,2 c. c. par kilogramme; par la voie veineuse nous avons pu injecter jusqu'à 3 c. c. sans produire le moindre accident.

Je crois inutile d'insister davantage sur l'importance que présentent ces données au point de vue de l'étude générale des névrotoxines; on devine aisément qu'en s'adressant à des sérums beaucoup moins toxiques que les précédents, la méthode des injections intracérébrales soit, dans certains cas, la seule qui permette de mettre en évidence avec facilité leurs effets nocifs sur la cellule nerveuse. Il ne faut pas oublier toutefois que l'expérience se présente dans des conditions de moins en moins favorables, au fur et à mesure que la toxicité du sérum étudié devient elle-même plus faible : la masse du liquide qu'il est nécessaire d'introduire dans le cerveau augmente, et on n'a plus la certitude que les phénomènes observés ne dépendent pas plutôt de troubles nerveux d'ordre purement mécanique. C'est ce qui se produit lorsqu'on étudie chez le lapin, ou chez le chien, des sérums normalement peu toxiques pour ces animaux, comme ceux de la plupart des mammifères par exemple.

Il n'est pas douteux d'ailleurs que ces difficultés techniques disparaîtraient s'il était possible de séparer les substances actives du sérum, et de les injecter dissoutes dans une quantité minime de véhicule.

Quoi qu'il en soit, on peut se rendre compte par ce qui précède de la facilité avec laquelle il sera possible de mettre en lumière par la méthode des injections intracérébrales les propriétés névrotoxiques d'un sérum. Les faits que nous allons rapporter justifieront à cet égard, il me semble, les considérations que nous avons cru devoir développer un peu longuement dans ce chapitre.

II. — Névrotoxines artificielles.

J'ai tenté tout d'abord d'obtenir expérimentalement un sérum toxique pour la cellule nerveuse du lapin en m'adressant au cobaye. Le sérum normal de cobaye n'exerce une action

nocive appréciable, chez le lapin, que s'il est injecté dans les vaisseaux à des doses très élevées. En injection intracérébrale, il ne produit aucun accident lorsqu'on ne dépasse pas les doses déjà considérables de 0,5 c.c. à 0,6 c.c. par kilogramme. Des doses sensiblement plus élevées sont rarement supportées sans inconvénient : mais on observe à peu près les mêmes phénomènes lorsqu'on injecte un liquide indifférent, tel que l'eau salée physiologique ou le sérum propre au même animal. Les accidents immédiats ou tardifs qui se produisent dans ces conditions ne dépendent donc pas de l'action toxique exercée par le sérum sur la cellule nerveuse. Ils relèvent de la compression oude la dilacération des centres nerveux par la masse de liquide injecté. Il est donc utile de s'en tenir, comme quantité, à la limite inférieure que nous avons indiquée, c'est-à-dire 0,5 c.c. par kilogramme.

Dans le but de faire apparaître dans le sérum de cobaye des propriétés névrotoxiques manifestes, nous avons injecté à une série de ces animaux, et à plusieurs reprises, une émulsion de cerveau et de bulbe de lapin. La plupart des cobayes traités ont reçu, à doses progressivement croissantes, 5 à 6 injections d'une émulsion de matière nerveuse, correspondant pour les dernières injections à la moitié de l'encéphale du lapin. Je dois dire que, dans leur ensemble, ces premiers essais ont été infructueux; le sérum des animaux préparés ne s'est guère montré plus toxique que le sérum normal.

Je noterai cependant, à titre d'indication, que quelques lapins ont présenté, après l'inoculation intracérébrale de 0,3 c. c. et 0,4 c. c. par kilogramme, des phénomènes parétiques généralisés aux quatre membres et quelques secousses convulsives ; mais ces accidents furent passagers : 3 ou 4 heures après l'injection, les animaux étaient complètement remis. Deux d'entre eux succombèrent toutefois tardivement, mais les phénomènes qu'ils ont présentés ne furent pas assez caractéristiques pour qu'il me soit permis d'affirmer que la mort doive être sûrement rapportée à une intoxication spécifique du système nerveux.

Il est possible qu'en s'adressant aux mêmes animaux et en répétant ces essais, on obtienne de meilleurs résultats; mais j'ai pensé que, pour réussir pleinement dans la préparation des névrotoxines, il était préférable de s'adresser à deux animaux d'espèce plus éloignée. Il semble, en effet, *a priori* qu'un animal

doive réagir d'autant mieux à l'introduction dans son organisme d'éléments cellulaires étrangers, que ces éléments se différencient davantage par leur constitution chimique de ses propres cellules. Or, nous savons que ces différences, à peine sensibles lorsqu'on considère deux espèces voisines, peuvent être très accusées lorsqu'on passe d'une classe à une autre.

J'ai choisi, pour la préparation de la névrotoxine, un mammifère et un oiseau[1]. Je me suis adressé au canard pour l'obtention du sérum; outre que cet animal m'avait déjà donné d'excellents résultats pour l'étude de la leucotoxine, il présente l'avantage, sur la plupart des oiseaux que l'on peut avoir à sa disposition dans les laboratoires, d'être très résistant, de pouvoir être soumis à des saignées répétées sans inconvénient, et de fournir en une seule fois, si besoin en est, une quantité notable de sang.

Comme animal d'épreuve, j'ai choisi le chien, qui est assurément un des animaux qui se prêtent le mieux à une analyse délicate des troubles physiologiques provoqués par les lésions du système nerveux. J'ajouterai que le chien est moins sensible que le lapin aux effets purement mécaniques des injections intracérébrales. Lorsqu'il s'agit de liquides n'ayant par eux-mêmes aucune toxicité propre, comme la solution physiologique, on peut en introduire une masse considérable dans les centres nerveux du chien, sans le moindre danger. Il nous est arrivé plusieurs fois d'injecter 2 c. c. par kilogramme, et même davantage, sans qu'il soit possible d'observer même passagèrement le moindre trouble moteur ou sensitif. La seule précaution à prendre est de faire l'injection au moyen d'une aiguille fine, et de pousser le liquide assez lentement. Les liquides albumineux, dont la diffusion et la résorption sont plus difficiles et plus lentes, sont moins facilement tolérés que l'eau salée, mais ce n'est là qu'une question de degré. Le chien supporte encore aisément, par exemple, des doses de son propre sérum équivalant à 1, 5 c. c. par kilogramme.

Après avoir éprouvé la sensibilité du chien vis-à-vis du sérum de canard, et m'être assuré que ce liquide peut être introduit à

1. Les expériences dont M. Metchnikoff a bien voulu nous rendre témoin se rapportent également à un sérum névrotoxique préparé en s'adressant à des animaux de classe différente. Le sérum étudié provenait de rats traités par des injections répétées de centres nerveux de pigeon.

doses relativement élevées dans le cerveau sans produire d'accidents, je me suis efforcé d'augmenter expérimentalement la toxicité de ce sérum pour les centres nerveux du chien. Dans ce but, une série de canards vigoureux, adultes, reçurent, dans l'espace de 2 mois environ, 5 à 6 injections intrapéritonéales progressivement croissantes, d'une émulsion aseptique de cerveau, de cervelet, de bulbe et de moelle de chien. Cette émulsion était faite dans la solution physiologique de NaCl et renfermait des quantités approximativement égales des différentes portions de l'axe cérébro-spinal[1]. Pour éviter l'introduction avec la matière nerveuse d'une trop grande quantité de sang, les animaux étaient toujours saignés à blanc, et, au besoin, les centres nerveux étaient lavés plusieurs fois à l'eau salée physiologique préalablement stérilisée. Malgré ces précautions, on injecte forcément une certaine quantité de globules rouges et de leucocytes, mais cette quantité étant réduite au minimum, l'augmentation du pouvoir hémolytique ou leucotoxique du sérum des animaux traités n'est guère appréciable.

La quantité de matière nerveuse injectée était relativement considérable: nous commencions par 8 à 10 grammes pour aller jusqu'à 15 ou 20 grammes et davantage. Quelques animaux ont succombé dans le cours de l'immunisation; la plupart de ceux qui ont résisté présentaient, après chaque injection, de la fièvre et de l'amaigrissement, mais ils revenaient rapidement à leur poids primitif. Les canards étaient généralement saignés 8 à 10 jours après la dernière injection, et le sérum obtenu était employé aussi frais que possible.

Nous avons eu soin, pour les expériences de contrôle faites avec le sérum normal, d'employer toujours également du sérum frais[2], et de multiplier les essais pour éviter les causes d'erreur

1. Quelques canards ont été traités exclusivement par du cerveau; d'autres n'ont reçu que du cervelet, du bulbe ou de la moelle. Le sérum de ces animaux fut dans tous les cas fortement névrotoxique, mais son action ne se limitait pas à l'organe pour lequel on l'avait préparé. En fait il nous a paru impossible d'obtenir des sérums spécifiques vis-à-vis des différentes parties de l'axe cérébro-spinal fonctionnellement différenciées.

2. Pour obtenir très rapidement une notable quantité de sérum d'oiseau, il est nécessaire d'avoir recours à un artifice. J'ai montré en effet (*Archives de Physiologie*, 1897) que le sang de ces animaux se coagule avec une très grande lenteur et n'expulse que tardivement une très faible quantité de sérum lorsqu'il est recueilli aseptiquement et à l'abri du contact des tissus. Pour obvier à cet inconvénient, les canards étaient saignés aseptiquement dans les éprouvettes de

dues aux variations individuelles. Afin d'avoir une base de comparaison plus certaine, nous avons d'ailleurs évalué chez quelques animaux la toxicité du sérum avant et pendant le cours du traitement. J'ajouterai qu'il est essentiel, lorsqu'on veut étudier dans de bonnes conditions les variations de la toxicité d'un liquide en employant la voie cérébrale, de toujours pratiquer les injections au même niveau. On peut observer des différences appréciables, parfois du simple au double, en injectant un même sérum soit dans la région frontale, soit dans la région occipitale. Je reviendrai plus tard sur l'explication de ces faits, je tiens simplement à signaler que dans toutes les expériences dont il va être question, les inoculations furent faites dans le lobe frontal, en avant des centres moteurs.

Voyons tout d'abord qu'elle est l'action exercée par le sérum normal de canard sur le système nerveux du chien ; il nous sera ensuite facile de lui comparer les effets produits par le sérum des animaux préparés.

Le sérum normal du canard est facilement supporté par le chien, même lorsqu'il est introduit dans les centres nerveux à doses relativement élevées. Tous les animaux injectés ont supporté. sans le moindre accident, 0,5 c.c.et 0, 6 c. c. par kilogramme. Quelques-uns seulement de ceux qui ont reçu 0,8 c. c. par kilogramme ont présenté des accidents, caractérisés par de la parésie, de l'affaissement, des secousses convulsives limitées; mais tous se sont remis. Il a été nécessaire d'atteindre, le plus souvent, 1 c. c. à 1, 2 c. c. par kilogramme, pour obtenir des phénomènes nerveux graves, tels que paralysie, crises épileptiformes, convulsions, contractures.

Mais encore, dans la plupart des cas, s'est-il agi de troubles passagers, qui se sont rapidement amendés et se sont terminés par la guérison des animaux.

Deux chiens seulement ont succombé à l'injection de 1 c. c. par kilogramme, et encore la mort a-t-elle été tardive (4 et 7 jours après l'expérience). Les animaux, après avoir présenté, pendant quelques heures, des accidents aigus, se sont remis par-

la machine centrifuge dans lesquelles on avait introduit préalablement un petit fragment de tissu. Il suffit ordinairement d'une heure de centrifugation pour obtenir par ce procédé une quantité de sérum égale au tiers et souvent même aux 3/5 de la masse totale de sang recueilli.

tiellement ; seule la paralysie des membres a persisté plus ou moins complètement jusqu'à la mort.

Je tiens à faire remarquer en passant qu'en injections intravasculaires, le sérum de canard n'est toxique pour le chien qu'à des doses très élevées. Ces animaux ne sont nullement touchés par des doses correspondant à 6 c. c. par kilogramme. J'ai même souvent injecté 8 et 10 c. c. sans provoquer de phénomènes nerveux.

Tous les canards soumis à l'immunisation n'ont pas réagi avec la même intensité, mais leur sérum s'est montré dans tous les cas beaucoup plus toxique pour la cellule nerveuse du chien que le sérum normal correspondant. Deux ou trois injections suffisent déjà d'ordinaire pour produire une augmentation très sensible de toxicité. Celle-ci s'accuse avec les injections suivantes pour atteindre un maximum qu'il est assez difficile de dépasser. Les chiffres suivants se rapportent aux sérums qui nous ont fourni les résultats les plus nets.

Les chiens injectés dans le cerveau avec des doses de 0, 5 c. c. ou 0, 6 c. c. par kilogramme, doses qui, nous le savons, ne produisent pas le moindre accident lorsqu'il s'agit du sérum normal, ont succombé très rapidement.

Dans la plupart des cas, la mort a été presque foudroyante. Quelques minutes après l'injection, les animaux présentaient de la parésie qui allait rapidement en s'accentuant. Incapables de se tenir sur les membres, ils tombaient bientôt sur le côté, essayaient quelques mouvements convulsifs et mouraient par paralysie des muscles respiratoires. 0, 3 c. c. et 0, 4 c. c. furent généralement suffisants pour produire à peu près le mêmes phénomènes, mais la paralysie s'établissait un peu plus lentement, les mouvements convulsifs étaient mieux caractérisés quoiqu'ils fussent rarement généralisés. Ils cessaient d'ailleurs assez vite pour faire place à une paralysie motrice et sensitive à peu près complète, étendue à toute la sphère des organes qui sont sous la dépendance de l'axe cérébro-spinal.

L'animal pouvait rester dans cet état pendant quelques heures ; la respiration, qui ne tardait pas d'ailleurs à devenir stertoreuse, était la seule manifestation apparente de la vie. Les mouvements respiratoires devenus irréguliers diminuaient eux-memes progressivement en nombre et en amplitude, et l'ani-

mal mourait par asphyxie. Il suffit, comme on pouvait s'y attendre, de pratiquer l'insufflation pulmonaire pour maintenir les chiens en vie ; ceux-ci se comportaient pour ainsi dire alors comme les animaux soumis à la respiration artificielle, après section sous-bulbaire de la moelle et évidemment plus ou moins complet du canal médullaire.

A doses élevées, les injections intracérébrales de névrotoxine déterminent donc la suppression rapide de toutes les activités nerveuses d'origine centrale. Le centre respiratoire seul résiste plus longtemps à l'intoxication. La destruction des éléments nerveux est d'emblée trop profonde et trop étendue pour que les phénomènes d'excitation puissent se manifester avec quelque intensité. Ce qui domine, ce sont les phénomènes attestant la suppression fonctionnelle des centres bulbo-médullaires.

La marche de l'intoxication est tout autre quand la quantité de sérum injecté est sensiblement plus faible. Ce sont alors les phénomènes d'excitation qui dominent la scène : la paralysie, les troubles sensitifs n'atteignent leur maximum que beaucoup plus tard, et bien que la mort des animaux soit la règle. elle ne se produit le plus souvent que 6 à 12 heures après l'injection.

Les animaux injectés avec 0, 1 c. c. et 0, 2 c. c. par kilogramme nous ont fourni à cet égard un série d'observations des plus intéressantes. Je me bornerai à en présenter une sorte de tableau schématique, correspondant, dans son ensemble, aux cas les plus fréquemment observés.

Les chiens ne présentent habituellement rien de particulier dans les premières minutes qui suivent l'injection, sauf que la plupart cherchent à fuir et vont, si on ne les maintient pas attachés, se blottir dans un coin. On s'aperçoit bientôt toutefois qu'ils fléchissent sur les membres, que la marche devient paresseuse. difficile et plus ou moins chancelante. Un quart d'heure ou une demi-heure après, ils sont d'ordinaire franchement parésiés, et ont les plus grandes difficultés à se maintenir quelques instants dans la station verticale. C'est à ce moment qu'éclatent les premiers accidents convulsifs, sous forme de crises épileptiformes plus ou moins caractérisées.

Quelques chiens ont présenté de véritables accès d'épilepsie franche. Rien ne manquait au tableau : cri initial, salivation, convulsions cloniques et toniques, miction. Ces crises épilepti-

formes se répétaient plusieurs fois pour être bientôt remplacées par des convulsions cloniques nettement caractérisées; ces convulsions, qu'il est facile de provoquer, qui se répètent spontanément sous forme d'accès, dont l'intensité et la durée augmentent jusqu'à un certain maximum.

Pendant les accès, l'animal, complètement couché sur le côté, présente des mouvements continuels de la tête et des membres, ayant soit le caractère de secousses fréquemment répétées et limitées à un groupe de muscles, soit le caractère de mouvements absolument désordonnés, qui ont pour effet de modifier constamment sa position.

Quand ces accès ont une certaine violence, les paupières sont closes, les globes oculaires rétractés et plus ou moins convulsés, la respiration est saccadée, le cœur très irrégulier. Dans la plupart des cas, on observe des sortes de cris ou d'aboiements convulsifs qui se commencent avec les accès et terminent avec eux. Les crises sont entrecoupées ou tout au moins presque toujours suivies de contractures plus ou moins violentes atteignant la plupart des muscles du squelette. Les animaux présentent alors une attitude des plus caractéristiques : les membres sont en extension complète, la tête est fortement penchée en arrière et renversée sur le cou, les mâchoires sont violemment serrées. Ces contractures persistent le plus souvent dans l'intervalle des crises, mais elles sont alors limitées à un membre, à la tête ou la mâchoire.

Dans cette période, les rémissions sont d'ailleurs de très courte durée, mais il est cependant facile de s'assurer que la paralysie augmente progressivement, que la sensibilité s'atténue, que le pouvoir réflexe de la moelle s'épuise. Tous ces symptômes, qui correspondent à une intoxication lente et graduelle des centres nerveux, sont avant tout des phénomènes d'excitation bulbo-médullaire. Tel est encore le cas de la salivation et aussi de la polyurie, qui ne manque pour ainsi dire jamais, et qui se traduit par d'abondantes émissions d'urine, spécialement dans l'intervalle des crises.

A la période d'excitation, qui peut durer 7 ou 8 heures, succède une période plus ou moins longue pendant laquelle les accès convulsifs, devenus de moins en moins fréquents, font place à la paralysie presque complète. L'aspect des animaux est, pour

ainsi dire, celui que présentent dès le début les chiens intoxiqués par de plus fortes doses, et la mort se produit dans les mêmes conditions.

Les doses comprises entre 0,06 c. c. et 0,1 c. c. ont encore été mortelles dans tous les cas, mais alors même que l'intoxication revêt une forme atténuée, elle présente encore dans son ensemble les mêmes caractères que ceux que nous venons d'indiquer.

Plusieurs chiens injectés avec un sérum qui s'était montré particulièrement toxique n'ont pas résisté à l'injection de 0,05 c. c. par kilogramme, et dans deux expériences 0,04 c. c. ont encore suffi à provoquer des accidents passagers. Or le même sérum essayé deux mois plus tôt, c'est-à-dire avant le début de l'immunisation, s'était montré dépourvu de toute activité lorsqu'il était injecté à la dose de 0,8 c. c. par kilogramme. Le sérum de ce canard avait donc acquis une toxicité au moins 20 fois plus forte que celle qu'il possédait primitivement.

Je tiens à rappeler que toutes ces expériences ont été faites sur des chiens adultes et vigoureux, dont le poids variait entre 4 et 8 kilogrammes. Si l'on s'adresse à des chiens nouveau-nés ou plus exactement à des chiens âgés seulement de quelques mois, on est frappé de la résistance considérable qu'ils présentent vis-à-vis des névrotoxines. Des chiens âgés de 2 à 5 mois ont supporté en injections intracérébrales jusqu'à 0.3 c. c. par kilogramme de sérum actif, sans le moindre inconvénient. Il fallait atteindre des quantités qui déterminent la mort presque foudroyante des animaux adultes, c'est-à-dire 0,4 c. c. et 0,5 c. c. pour obtenir des accidents graves; et encore la survie fut-elle la règle.

J'ai cru qu'il était utile de signaler ces particularités si l'on voulait éviter toute erreur dans l'interprétation des expériences. Il est d'autre part intéressant de rapprocher ces faits de ceux que fournit l'étude d'autres sérums cytotoxiques. J'ai constaté que les hématies des chiens jeunes sont beaucoup plus résistantes que les globules rouges des chiens adultes à l'action des sérums hémolytiques artificiels. Je rappelle à ce propos que Camus et Gley[1] ont observé de leur côté que les globules rouges des lapins nouveaux-nés présentent une très grande résistance à l'action dissolvante du sérum d'anguille.

1. Camus et Gley, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1899, p. 779.

Il semble donc qu'il s'agisse là d'un fait général, et que tous les éléments cellulaires des animaux jeunes soient particulièrement résistants à l'égard des cytotoxines.

Les expériences que nous venons de rapporter démontrent avec évidence qu'il est possible d'obtenir expérimentalement des sérums fortement toxiques pour la cellule nerveuse.

Il nous restait à rechercher si les propriétés de ces sérums sont spécifiques, autrement dit si la névrotoxine limite son action à la cellule nerveuse de l'espèce animale pour laquelle elle a été préparée, et, d'autre part, si cette action est exclusive, c'est-à-dire n'appartient pas à d'autres sérums cytotoxiques artificiels.

Après avoir déterminé la toxicité du sérum normal de canard pour le lapin et le chat, nous avons injecté à quelques-uns de ces animaux le sérum des canards traités par des injections répétées de tissu nerveux de chien. Dans 4 expériences faites sur le lapin, il ne nous a pas été permis de constater une augmentation appréciable de toxicité.

Par contre, le chat s'est montré plus sensible à l'action du sérum des animaux préparés ; mais l'augmentation de toxicité que nous avons constatée fut dans tous les cas bien inférieure à celle que l'on observe lorsque le sérum est injecté au chien.

Ces faits sont à rapprocher de ceux qui ont été observés dans l'étude des sérums hémolytiques. Il arrive assez souvent, en effet, que l'hémotoxine se montre plus ou moins efficace pour les globules rouges d'espèces tierces, mais son activité est toujours faible si on la compare aux effets produits par le sérum étudié sur les hématies de l'espèce pour laquelle on l'a préparé.

Plus importante était la question de savoir si l'action destructive de la névrotoxine ne s'exerce que vis-à-vis de la cellule nerveuse. S'il n'est pas douteux que, dans les conditions expérimentales que nous avons réalisées pour en faire l'étude, les sérums névrotoxiques localisent absolument leur action sur les centres nerveux, il n'en est pas moins vrai qu'il était utile de rechercher s'ils ne manifestent pas des effets toxiques tout aussi marqués lorsqu'ils sont mis directement en contact avec d'autres éléments cellulaires. Or, malgré l'injection répétée, avec la matière nerveuse, d'une certaine quantité très faible, il est vrai, de globules rouges et de leucocytes, les sérums les plus actifs

n'ont pas montré un pouvoir hémolytique ou leucolytique sensiblement augmenté. Il n'y avait aucune comparaison à établir à cet égard entre leur activité et celle des sérums que nous avons obtenus chez le canard par des injections de globules rouges ou de leucocytes de chien.

D'ailleurs, la contre-épreuve de ces expériences s'imposait, et puisque nous avions à notre disposition des sérums de canard fortement toxiques pour les hématies du chien, il était tout indiqué de rechercher comment ils se comportent lorsqu'ils sont injectés dans les centres nerveux.

Or, l'expérience nous a montré que, même lorsqu'ils sont injectés à la dose de 0,4 c. c. et 0,5 c. c. par kilogramme, ces sérums ne produisent pas d'accidents nerveux. On se rappelle qu'à doses équivalentes, les sérums névrotoxiques que nous avons étudiés déterminent la mort presque foudroyante des animaux, et qu'il suffit habituellement d'en injecter des quantités 10 fois plus faibles pour provoquer des troubles nerveux très graves.

Comme les autres sérums cytotoxiques déjà préparés jusqu'ici, les sérums névrotoxiques artificiels sont donc spécifiques.

Il me reste maintenant à décrire les lésions provoquées par la névrotoxine; cette étude fera l'objet d'un prochain mémoire.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

Le Gérant : G. Masson.

14me ANNÉE NOVEMBRE 1900 N° 11

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

CONTRIBUTION

A L'ÉTUDE DE LA FIÈVRE TYPHOIDE ET DE SON BACILLE

DEUXIÈME PARTIE[1]

Recherches sur l'antagonisme entre le Bacille coli et le Bacille typhique.

PAR L. RÉMY

Dr ès-sciences et en médecine,
Chef des travaux à la section de bactériologie annexée au
Laboratoire d'analyses de l'État à Liége.

La conception déjà ancienne de l'écrasement du B. typhique par les bactéries saprophytes en général, et par le bactérium coli en particulier, domine, à l'heure actuelle encore, la pathogénie de la fièvre typhoïde. Invoquée par Gaffky pour expliquer les insuccès qu'il avait obtenus dans la recherche du B. d'Eberth dans les selles de typhisés, elle a été reprise plus tard par les partisans de l'école lyonnaise, qui en ont fait un argument de valeur en faveur de l'origine côlienne de la diothénentérie. C'est ainsi qu'en 1894 Wathelet[2], dans le laboratoire de Malvoz, recherche vainement après 5, 10, 15 jours, etc., le B. typhique dans des tubes de bouillon ensemencés avec 3 anses d'une culture de B. d'Eberth et une anse d'une culture de B. coli. Toujours, par la méthode des plaques, il obtient une culture pure de B. coli. Il en conclut que le B. typhique succombe dans la lutte qui s'établit entre les 2 microbes. Les expériences de Wathelet ont été confirmées par Grimbert[3].

1. Voir ces *Annales*, tome XIV, n° 8.
2. Recherches bact. sur les déjections dans la f. typhoïde, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1895, p. 252.
3. Rech. du B. d'Eb. dans l'eau, *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1894.

Les résultats de Wathelet et Grimbert sont en opposition avec les observations de Pottien[1], qui a constaté qu'une nouvelle explosion de fièvre typhoïde se produisit, en 1897, chez les personnes qui firent usage de l'eau d'une pompe soustraite à l'alimentation lors de l'épidémie antérieure de 1896. Le bacille d'Eberth avait donc résisté à la concurrence vitale des autres bactéries. Remlinger et Schneider[2] ont d'ailleurs retrouvé le B. typhique dans l'eau pendant les 3 mois qui suivent la cessation de la maladie.

En présence de ces résultats contradictoires sur l'antagonisme entre les B. typhique et coli, selon que les deux organismes vivent dans des mélanges artificiellement préparés ou qu'ils se trouvent dans les conditions habituelles de leur existence, de nouvelles recherches s'imposaient. Elles s'imposaient d'autant mieux, que dans les expériences de Wathelet l'écrasement du B. typhique par le B. coli n'était pas la seule interprétation capable d'expliquer l'absence de colonies éberthiennes sur les plaques de gélatine. On pouvait tout aussi légitimement attribuer celle-ci à l'imperfection des procédés employés par l'auteur pour retirer le B. d'Eberth du mélange. Il lui était d'ailleurs facile de déterminer laquelle de ces deux hypothèses s'accordait le mieux avec ses expériences. Pour cela, il suffisait de faire des plaques de contrôle, et de rechercher le B. typhique non pas après 5, 10, 15 jours de vie en commun avec le bacille coli, mais bien au moment du mélange des deux organismes. Nous sommes convaincu qu'à l'aide de la gélatine ordinaire il aurait éprouvé la même difficulté dans l'un et l'autre cas. Il pouvait également repiquer toutes les colonies apparues sur les plaques faites avec les mélanges 5, 10, 15 jours après leur préparation, et alors, il aurait certainement constaté que le B. typhique vivait parfaitement de compagnie avec le B. coli.

Une autre raison nous a engagé à reprendre ces expériences sur l'antagonisme entre les deux bacilles coli et typhique. L'étude des modifications que la vie en commun peut apporter à ces deux organismes n'a jamais été faite : il était donc intéressant d'entreprendre des recherches dans cet ordre d'idées;

1. Die Typhus Epidemie des Jahres 1897 in Gräfentonna, *Centrabl. f. Bakt.*, B. XXIV, 1898.

2. Contribution à l'étude du B. typhique, *Annales de l'Institut Pasteur*, tome XI, année 1897.

notre gélatine différentielle nous a permis de combler cette lacune.

Expérience I. — Nous nous sommes servi des B. coli et typhique retirés par nous de la selle 20.

Mode opératoire. — Dans un matras de 2 litres contenant 1 litre d'eau peptonisée (peptone Witte 3 0/0, NaCl, 0.5 0/0) exactement neutralisée, nous ajoutons le 7 juillet 5 c. c. d'une culture de B. coli en bouillon âgée de 24 h., et 5 c. c. d'une même culture de B. typhique. Après agitation nous abandonnons le mélange à la température de la chambre, c'est-à-dire 22° à 27°. Nous opérons de même en eau peptonisée acidifiée par H^2SO^4, 0.5 0/00, après neutralisation préalable.

Pour faciliter l'exposé des résultats nous désignerons :

Par E, la culture en eau peptonisée neutre;

Par H, — — — acide;

Par B. t. s. 20 le B. typhique retiré de la selle 20;

Par B. c. s. 20 — coli — — —

Caractères des bacilles coli et typhique avant la vie commune.

B. c. s. 20 donne de l'indol, fait énergiquement fermenter la lactose, est légèrement mobile.

B. t. s. 20 est très mobile, est agglutiné à 1/70,000 par le sérum antityphique expérimental.

Après un nombre variable de jours de vie commune, nous avons fait, avec le mélange, à l'aide de notre gélatine différentielle (lactosée, acide, phéniquée, voir 1re partie), des plaques de culture comme suit :

1re *dilution*, une anse double du mélange préalablement agité, dans 10 c. c. d'eau stérilisée;

2e *dilution*, une anse double de la 1re dans 10 c. c. d'eau stérilisée. 1, 2, 3, anses de la seconde dilution ont servi à faire 3 plaques de gélatine.

Pour chacun des examens nous avons repiqué 10 colonies côliennes et autant d'éberthiennes : nous avons différencié les organismes à l'aide des caractères que nous leur avons énumérés ci-dessus (gaz, indol, agglutination).

Résumé des résultats obtenus par les ensemencements du mélange. — Le 12 juillet, 1er ensemencement. Le 14, développement des colonies typhiques et côliennes. Le 18, nous comptons sur la plaque n° 1 (1 anse de la 2e dilution) 100 colonies dont 50 coliformes et 50 éberthiformes, approximative-

ment[1], tant pour les cultures du matras E que pour celles du matras H.

Caractères des organismes après 5 jours de vie commune :

B. COLI. — Ils ont conservé leurs caractères.

B. TYPHIQUE. — Ceux que nous avons retirés des mélanges neutre ou acide avaient perdu leur sensibilité vis-à-vis des agglutinines; même à 1/10, ils n'étaient plus agglutinés par le sérum qui auparavant se montrait actif à la dilution de 1/70.000. Ils sont conservés dans notre collection avec les initiales tH^{I}, tE^{I}.

Le 23 juillet, 2e ensemencement, mêmes résultats que pour le 1er.

Le 2 août, 3e ensemencement. Résultats. — Les colonies typhiques n'apparaissent plus que le 4e jour : elles ont conservé leur aspect *blanc bleuté*, mais restent plus petites que dans les ensemencements antérieurs; elles diminuent en nombre proportionnellement aux colonies côliennes (50 t pour 70 c.). Les colonies côliennes acquièrent également moins de volume qu'antérieurement; en outre, certaines d'entre elles sont petites, *bleutées*, elles se rapprochent des colonies typhiques avec lesquelles on les confond quand on n'est pas prévenu; il est d'ailleurs prudent d'en repiquer un certain nombre afin de se convaincre de leur nature côlienne.

Les organismes coli et typhique ont les mêmes caractères que ceux que nous avons constatés après 5 jours de vie commune. Nous avons conservé dans notre collection tH_{II} et tE_{II}.

Les ensemencements 4 (22 août) et 5 (9 septembre) ne nous apprennent rien de particulier.

Le 29 septembre, 6e ensemencement. Développement le 4 octobre. Le nombre des colonies ayant considérablement diminué, nous les comptons sur la plaque n° 2 (2 anses de la 2e dilution). Nombre total, 85, coli 60, typhosus, 25.

Caractères des organismes après 82 jours de vie commune :

BACILLE COLI. — Les bacilles coli que nous avons retirés du matras E (neutre) ne donnent plus la réaction de l'indol, mais font encore fermenter la lactose. Les B. coli du matras H (0, 5/1000 H^2SO^4) ont conservé leurs propriétés (gaz, indol).

BACILLE TYPHIQUE. — Mêmes caractères qu'après 5 jours de vie commune pour E et pour H.

Le 19 octobre, 7e ensemencement. Après 6 jours on peut distinguer les colonies.

Matras E, plaque n° 2, 60 colonies parmi lesquelles il est difficile de distinguer avec certitude des colonies typhiques et des colonies côliennes.

Toutes les colonies que nous avons repiquées de cette plaque ont fourni des organismes qui ne donnaient ni gaz, ni indol; ils n'étaient pas non plus agglutinés. Ce sont les bacilles tE^{VI} et CE^{VI} de notre collection[2].

Matras H. — Plaque n° 2. — 200 colonies, 150 coli, 50 typhiques.

Caractères des 2 organismes :

1. Voir ce que nous avons dit à ce sujet dans la 1re partie, ces *Annales*, tome XIV, 25 août 1900, page 566.

2. Cette dénomination de typhique et coli leur a été donnée en nous basant sur l'aspect des colonies et l'étude d'autres caractères (voir plus loin).

A) Bacilles coli. — Donnent encore la réaction de l'indol et font encore fermenter la lactose.

B) Bacille typhique. — Il est toujours mobile, il paraît devenu plus grêle, il n'est pas agglutiné.

Le 26 octobre, 8e ensemencement. Les résultats confirment ceux de l'observation antérieure.

Pour le matras E. — Le nombre de colonies est tombé à 30 sur la plaque no 2. Les bacilles isolés sont très affaiblis, et ce n'est qu'après une série de passages sur gélose que nous sommes parvenu à leur rendre un peu de vitalité. Toutefois, actuellement encore, ils ne donnent ni indol ni gaz, ils ne sont pas agglutinés. Ce sont les B. tEvii et cEvii.

Matras H. — Le bacille coli existe seul dans le matras H, il donne encore indol et gaz, mais il diminue en nombre, 80 sur la plaque no 2, au lieu de 150 lors de l'ensemencement précédent.

Les bacilles coli et typhique conservés depuis longtemps dans les laboratoires perdent-ils également leurs propriétés (gaz, indol, agglutination), lorsqu'on les place dans les mêmes conditions que les organismes retirés de la selle 20?

Pour nous en assurer, nous nous sommes servi du B. coli Gand et du B. typhique Liége que nous tenons, depuis 1891, de l'obligeance de M. le professeur Van Ermengem; nous avons opéré comme dans l'expérience I; toutefois nous n'avons utilisé que l'eau peptonisée neutre, qui seule dans l'expérience I avait modifié les propriétés des deux bacilles.

Caractères des B. coli et typhique avant la vie commune.

Bacille coli. — Il fait énergiquement fermenter la gélatine lactosée; il donne la réaction de l'indol, mais faiblement; il est très mobile.

Bacille typhique. — Il est agglutiné à 1/80,000 par le sérum antityphique expérimental.

Pendant les 3 premières semaines, les colonies des 2 organismes sont très distinctes. A partir de ce moment la différence s'atténue. En outre, les colonies typhiques deviennent très rares (2 ou 3 pour 100 côliennes). Nous avons alors ajouté au mélange 10 c. c. d'une culture en bouillon (24 h.) de B. typhique Liége, retiré du matras le 21e jour de la vie commune.

Après 4 mois les B. coli et typhique étaient encore vivants, tous deux avaient conservé leurs propriétés, les B. coli étaient plus nombreux que les B. typhiques.

La vie en commun est-elle nécessaire pour priver les organismes coli et typhiques de leurs propriétés?

Expérience III. — *Culture de B. t. s. 20 en eau peptone neutre.*

Après 1 mois le B. t. s. 20 avait conservé sa sensibilité vis-à-vis du sérum expérimental.

Expérience IV. — *Culture en eau peptone neutre de C. s. 20.*

Après 4 mois, le B. coli s. 20 possédait encore ses caractères biochimiques. Le résultat est le même si après 3 semaines de vie commune du B. t. s. 20, et B. c. s. 20, on laisse ce dernier continuer à vivre seul (voir expérience II).

Les bacilles coli et typhique retirés d'autres selles de typhisés se comportent-ils comme les organismes de la selle 20 ?

Pour répondre à cette question nous avons fait vivre ensemble les B. coli et typhique retirés des selles 22 et 23.

Après 3 mois chacun des bacilles isolés de ces deux selles avait conservé ses propriétés (indol, gaz, agglutination).

Des expériences qui précèdent, il résulte que des 4 B. d'Eberth qui ont servi à l'étude de l'antagonisme entre le B. typhique et le B. coli, un seul, celui de la selle typhique 20, a perdu sa sensibilité vis-à-vis des agglutinines. Nous sommes donc naturellement amenés à nous demander, si les bacilles typhiques de la selle 20 tE^{I}, tH^{I}, tE^{II}, tH^{II}, etc., retirés du mélange après 5, 16, etc., jours de vie commune (Exp. I) sont des bacilles typhiques non agglutinables ou des bacilles coli privés de leurs propriétés (gaz, indol).

Cette demande est d'autant plus légitime que l'expérience I nous a appris que B. c. s. 20 ne donnait plus ni gaz ni indol vers le 3e mois, tandis que vers la 3e semaine déjà certaines colonies côliennes profondes avaient pris l'aspect éberthiforme. Ne se pourrait-il pas que les B. coli perdissent leurs propriétés dès le 5e jour déjà, et qu'alors nous eussions considéré ceux-ci comme B. typhiques non agglutinables. S'il en était ainsi, le B. coli aurait étouffé le B. typhique dès le 5e jour, et notre expérience I confirmerait purement et simplement celles de Wathelet et Grimbert sur l'antagonisme entre le B. coli et le B. d'Eberth.

Remarquons d'abord que pour les bacilles retirés du matras H (acide H^2SO^4 0.5 p. 1,000), le doute n'est pas possible, car dans celui-ci le B. coli a conservé ses propriétés distinctives (gaz, indol) alors même que le B. typhique n'existait plus dans le mélange ou du moins n'était plus décelable par les plaques de gélatine différentielle. Les bacilles retrouvés dans le matras E (neutre) restent donc seuls en cause.

Rappelons qu'ils proviennent de colonies petites, blanc bleuté, profondes, qu'ils ne donnent ni gaz ni indol, et qu'ils ne sont pas agglutinés par le sérum antityphique expérimental. Avant d'essayer de déterminer leur origine typhique ou côlienne, il était indispensable, pour éviter des recherches inutiles, d'avoir

la certitude absolue que les bacilles typhique et coli de la selle 20 peuvent réellement perdre leurs propriétés (agglutination, gaz, indol). Les résultats fournis par l'expérience II, précédemment relatée, nous ont permis de projeter la lumière sur cette importante question. Ils nous ont en effet appris que les bacilles typhique Liége, et coli Gand, conservaient leurs propriétés lorsqu'ils vivaient en commun dans l'eau-peptone neutre; il nous était donc toujours facile de les distinguer sûrement. Nous avons tiré parti de cette constatation utile pour réaliser deux nouvelles expériences :

EXPÉRIENCE VII. — *Vie en commun de B. t. s. 20 et B. coli Gand* (en eau peptone neutre).

Résultat. — Après 6 jours le B. t. s. 20 avait perdu sa sensibilité vis-à-vis des agglutinines; le B. coli Gand avait conservé ses propriétés, indol et gaz, même après 4 mois.

EXPÉRIENCE VIII. — *Vie en commun de B. c. s. 20 et B. typhique Liége* (en eau peptone neutre).

Résultat. — Nous avons opéré comme pour l'expérience II, et nous avons constaté :

1° Que le bacille typhique Liége conserve sa propriété d'être agglutiné même après 3 mois ;

2° Qu'à ce moment le B. c. s. 20 ne donnait plus d'indol, et ne faisait plus fermenter la lactose.

Ces deux expériences confirment les résultats de l'observation I ; elles nous permettent d'affirmer que lorsqu'on fait vivre en eau peptone neutre les bacilles typhique et coli retirés de la selle 20, le bacille typhique perd sa sensibilité vis-à-vis des agglutinines dès le 5e et 6e jour, tandis que le B. coli n'est dépourvu de ses propriétés (indol et gaz) que vers le 3e mois de la vie commune.

Elles nous fournissent ainsi la preuve de la nature typhique des bacilles tEI, tEII, tEIII, tEIV, tEV, qui ne sont plus agglutinés, mais qui ont été retirés du mélange avant le 3e mois, c'est-à-dire avant que le bacille coli ait été privé de ses caractères distinctifs gaz et indol. Enfin elles nous autorisent à conclure que le bacille typhique a vécu au moins 3 mois à côté du bacille coli dans un mélange les renfermant tous les deux.

Nous venons de voir que la vie en commun peut priver les B. typhiques et les bacilles coli de leurs propriétés distinctives;

comment alors peut-on reconnaitre les B. typhique et coli ainsi dépourvus de leurs caractères différentiels ?

Caractères des bacilles coli et typhiques ayant perdu leurs propriétés distinctives.

I. Forme.

A.) *B. coli.* Il est plus gros, plus court et moins mobile que l'organisme dont nous sommes partis ; toutefois, après plusieurs passages successifs sur gélose, le bacille repiqué en bouillon retrouve sa forme et sa mobilité primitives.

B.) *B. typhique.* Il a conservé sensiblement sa forme et sa mobilité ; toutefois les cultures un peu âgées et même les cultures jeunes placées à 37° présentent une grande tendance à la formation de longs filaments. Les cils sont particulièrement difficiles à colorer.

II. Caractères culturaux.

Bouillon ordinaire. Le B. coli le trouble dans toute la masse, l'épaissit considérablement et lui donne un aspect gluant, gélatineux. Parfois aussi il donne un voile superficiel.

Le B. typhique donne un trouble uniforme ; par agitation, on observe le chatoiement caractéristique des organismes mobiles. A la surface du bouillon il y a une pellicule, d'ordinaire mince, parfois cependant assez épaisse.

Gélose inclinée. Pour les deux bacilles le développement est maigre, plus marqué cependant pour le B. typhique que pour le B. coli. Il importe de remarquer que les B. coli qui donnent un voile en bouillon se développent seuls en strie, les B. coli qui ne produisent pas de pellicule superficielle en bouillon poussent peu ou point le long de la strie. Si nous nous rappelons que nous avons toujours agité vivement le matras au moment de l'ensemencement des plaques, nous aurons probablement là l'explication de cette particularité étrange. Les bacilles coli provenant du fond du matras troublent le bouillon, mais ne végètent pas lorsque nous les ensemençons du bouillon sur gélose (strie). Les B. coli venant de la surface donnent un voile dans le bouillon, et se développent bien sur gélose inclinée (strie).

Gélatine. Par piqûre en tube les deux bacilles donnent un aspect semblable.

III. Caractères des colonies sur plaques.

A.) *B. typhique.* Les colonies superficielles, comme nous l'avons démontré dans la première partie de notre travail, sont excessivement rares ; nous n'examinons donc que les colonies profondes. Celles-ci sont petites et blanc bleuté.

B.) *B. coli.* Ses colonies sont superficielles ou profondes. *Superficielles*, elles sont étalées ou globuleuses; *profondes*, elles sont assez volumineuses, d'une coloration jaune brunâtre, ou bien elles sont bleutées et punctiformes. Plus de détails seraient superflus. la description même parfaite ne vaut en effet pas l'examen que l'on peut en faire soi-même.

Avant de quitter cette étude des caractères culturaux, nous attirons tout particulièrement l'attention sur les deux faits suivants :

1° Les bacilles coli et typhiques ainsi dépourvus de leurs propriétés par la vie en commun à la température de la chambre (du 7 juillet au 29 octobre) ne se développent plus à 37° ; ils ne troublent pas le bouillon; ils poussent au contraire abondamment entre 25 et 30° ;

2° Après un certain nombre de réensemencements successifs en bouillon ou sur gélose inclinée, les B. coli et typhique, même affaiblis, retrouvent leur énergie vitale, mais ils ne récupèrent pas leurs propriétés distinctives (gaz, indol, agglutination).

Les bactériologistes sont unanimes à reconnaître que les caractères morphologiques et culturaux sont trop contingents pour pouvoir servir de base à la différenciation des espèces côlienne et typhique ; à plus forte raison devons-nous les récuser lorsqu'il s'agit de la détermination d'organismes privés de leurs propriétés spécifiques.

Si nous ajoutons d'autre part que les expériences VII et VIII nous ont donné de sérieuses présomptions en faveur de l'origine typhique des bacilles tE^{I}, tE^{II}, tE^{III}, tE^{IV}, tE^{V}, retirés du mélange avant que le B. coli eût perdu ses propriétés, mais que les organismes tE^{VI}, tE^{VII}, cE^{VI}, cE^{VII}, retirés ensuite, ont été classés par nous comme B. typhique ou B. coli en nous basant exclusivement sur les caractères culturaux dont nous venons de récuser la valeur, nous aurons montré qu'il était indispensable, pour confirmer notre diagnose, de rechercher s'il existe des moyens nous permettant de déterminer si nos organismes

mobiles, ne donnant ni gaz, ni indol, et n'étant pas agglutinés, appartenaient au groupe des typhiques ou à celui des coli.

Le premier procédé consistait à tâcher de rendre aux organismes leurs caractères typhiques ou côliens. D'un haut intérêt scientifique, ce procédé ne pourrait guère être utilisé dans la pratique courante de l'analyse bactériologique des eaux, que nous envisageons surtout dans le présent travail : nous l'avons donc réservé pour des recherches ultérieures.

Une autre preuve, d'un emploi plus facile, nous est donnée par la propriété que possèdent les animaux immunisés par l'injection répétée de cultures microbiennes, de fournir un sérum agglutinant le microbe injecté à l'exclusion de tout autre organisme. Nous avons donc injecté, à des cobayes adultes, les bacilles tE^{I}, tE^{II}, tE^{III}, tE^{IV}, tE^{V}, tE^{VI}, tE^{VII}, cE^{VI}, cE^{VII}, et nous avons recherché si le sérum agglutinait le bacille coli ou le B. typhique retiré de la selle 20 dont nous étions partis.

Procédé opératoire. — Nous nous sommes adressé à la voie sous-cutanée et nous avons introduit tous les 2 jours, sous la peau d'un cobaye, 2 c. c. d'une culture en bouillon âgée de 2 jours.

Après 15 jours, une incision pratiquée dans l'oreille du cobaye nous a permis d'obtenir le sérum dont nous avons recherché le titre agglutinant. L'agglutination a été faite avec des cultures jeunes (18 à 22 h.) en bouillon, comme suit : à l'aide d'une pipette Pasteur stérilisée, nous prélevions 9, 19, 29, etc. gouttes de bouillon de culture, que nous laissions tomber dans des verres de montre. Cette même pipette rincée plusieurs fois par aspiration d'eau distillée, servait alors à ajouter au contenu des verres de montre une goutte du sérum pur ou dilué dont nous recherchions la propriété agglutinante. Après agitation, nous couvrions les verres de montre et les abandonnions à la température de la chambre. Après une heure et demie de contact, nous examinions l'agglutination à l'œil nu et au microscope. Chaque fois nous préparions un témoin dans les mêmes conditions que les échantillons à agglutiner, mais nous n'y ajoutions pas de sérum. Cette précaution est nécessaire, parce que nous avons parfois constaté que des cultures en bouillon qui, en tubes, ne donnaient pas de faux amas, agglutinaient au contraire spontanément dans les préparations témoins. Une autre

cause d'erreur, contre laquelle il faut se mettre en garde, réside dans le fait que le sérum normal de cobaye agglutine presque toujours le B. d'Eberth à 1/5 ou 1/10, rarement à 1/20. Il n'agglutine qu'exceptionnellement le B. coli à 1/10 ou 1/20.

Expérience I. — Injection de tE^{I}, c'est-à-dire du bacille typhique de la selle 20, retiré du mélange des B. typh. et coli de la selle 20, après 5 jours de vie en commun.

Pour cette expérience, nous avons continué les injections tous les 2 jours pendant 9 semaines, afin de nous renseigner sur le nombre d'injections nécessaires pour que le sérum atteigne le maximum de son pouvoir agglutinant.

Nous résumons les résultats dans le tableau suivant :

BACILLES soumis à l'épreuve.	TITRE AGGLUTINANT APRÈS				
	15 jours.	3 semaines.	5 semaines.	7 semaines.	9 semaines.
B. t s. 20...........	1/80	1/400	1/8000	1/8000	1/8000
tE_{I} (injecté).........	1/80	1/150	1/600	1/1000	1/2000
tH_{I} (retiré du mélange acide	1/80	1/150	1/500	1/800	1/1500
B. c. s. 20..........	1/10 nul.	1/10 nul.	1/10 nul.	1/10 nul.	1/10 nul.

Conclusions.

1° Le cobaye injecté avec tE^{I} fournit un sérum qui agglutine le bacille typhique de la selle 20 à l'exclusion du B. coli de la même selle : en conséquence, le B. tE^{I} est bien le B. typhique de la selle 20 que la vie en commun a privé de sa sensibilité vis-à-vis des agglutinines du sérum antityphique expérimental;

2° Le sérum agglutine le B. typhique de la selle 20 à un titre beaucoup plus élevé que le B. tE^{I} qui a servi à l'injection;

3° Le pouvoir agglutinant atteint son maximum 5 semaines après la première injection pour le B. typhique de la selle 20. A partir de ce moment, de nouvelles injections n'influencent plus le titre agglutinant. Pour le B. injecté, au contraire, le titre maximum n'est obtenu que 9 semaines après la première injection.

N. B. — Une expérience faite avec le bacille tH^{I} a donné des résultats identiques.

N. B. — Dans cette première expérience nous avons donné le résultat de l'agglutination pour divers échantillons de B. typhiques. Nous croirions sortir de notre sujet actuel, si, dans les expériences qui suivront, nous nous occupions de l'agglutination des bacilles autres que t. s. 20 et c. s. 20 [1]. Ce sont en effet les seuls qui présentent une importance réelle au point de vue de l'étude de l'« antagonisme entre le B. typhique et le B. coli » qui fait l'objet de cette seconde partie de notre travail; ce sont les seuls aussi dont l'agglutination puisse nous permettre de résoudre la question que nous nous sommes posée au début de ce chapitre : *déterminer si nos organismes mobiles ne donnant ni gaz ni indol, et n'étant pas agglutinés, appartenaient au groupe des typhiques ou à celui des coli de la selle* 20.

Expérience II. — Pour celle-ci nous nous sommes adressé au bacille tE^{V}, retiré du mélange le 82e jour de la vie commune. Le B. coli s. 20 ne donnait plus d'indol, mais faisait encore fermenter la lactose. Nous avons opéré comme pour l'expérience I.

BACILLES	TITRE AGGLUTINANT APRÈS				
	15 jours.	3 semaines.	5 semaines.	7 semaines.	9 semaines.
B. t. s. 20..........	1/50	1/200	1/500	1/600	1/600
B. c. s. 20..........	néant.	néant.	néant.	néant.	néant.

Conclusions.

1° Le cobaye injecté avec tE^{V} fournit un sérum qui agglutine le B. typhique de la selle 20 à l'exclusion du B. coli de la même selle. En conséquence, le B. tE^{V} retiré du mélange le 82e jour est bien le B. t. s. 20 que la vie en commun avec le B. c. s. 20 a privé de sa sensibilité vis-à-vis des agglutinines du sérum antityphique expérimental;

2° Puisque les B. tE^{I} et tE^{V} retirés respectivement du mélange le 5e et 82e jour de la vie commune sont les B. typhiques de la selle 20 privés de leur propriété agglutinante, les bacilles

1. Nous y reviendrons dans un prochain mémoire, et nous résumerons alors les expériences que nous avons entreprises relativement au mécanisme et à l'essence de ce phénomène ainsi qu'aux conditions qui peuvent le faire disparaître chez le B. typhique.

tE^{II}, tE^{III}, tE^{IV} retrouvés dans le mélange entre le 5e et le 82 jour sont aussi des échantillons du même bacille.

Nous avons ainsi montré d'une façon indubitable que les bacilles tE^{I}, tE^{II}, tE^{III}, tE^{IV}, tE^{V}, retirés du mélange entre le 3e et le 82e jour de la vie commune, *alors que le B. coli n'était pas encore privé de ses propriétés distinctives, sont des représentants du B. t. s.* 20.

En est-il de même des B. tE_{VI} et B. tE^{VII}, retrouvés dans le mélange le 102e jour et le 121e de la vie commune, *alors que le B. coli était privé de ses caractères distinctifs ?* Les expériences suivantes nous permettront de résoudre cette question.

Expérience III. — Nous nous sommes servi du B. tE^{VI}, retiré du mélange le 102e jour de la vie commune. A ce moment B. c. s. 20 était dépourvu de ses propriétés (gaz, indol).

L'expérience montre que, pour les deux bacilles soumis à l'épreuve, le titre agglutinant est nul après 15 jours, 3, 5, 7 et 9 semaines.

Conclusion. — Le sérum de cobaye injecté avec tE^{VI} n'agglutine pas le B. t. s. 20, il est également sans action sur le B. c. s. 20. Nous ne pouvons donc pas avoir de certitude relativement à l'origine côlienne ou typhique du B. tE^{VI}.

Expérience IV. — Nous avons injecté le B. coli cE^{VI} afin de tâcher d'en déterminer la nature.

BACILLES	TITRE AGGLUTINANT APRÈS				
	15 jours.	3 semaines.	5 semaines.	7 semaines.	9 semaines.
B. t. s. 20	néant.	néant.	néant.	néant.	néant.
B. c. s. 20	1/30	1/50	1/100	1/100	1/150

Conclusion. — 1°) Le sérum du cobaye injecté avec cE^{VI}, agglutinant le B. coli de la s. 20 à l'exclusion du B. t. s. 20, nous sommes autorisé à considérer cE^{VI} comme étant le B. c. s. 20, privé de ses propriétés (gaz, indol) par suite de la vie en commun avec le B. t. s. 20.

2°) Puisque le cE^{VI} est bien le B. c. s. 20 ayant perdu ses caractères distinctifs, nous croyons pouvoir admettre que B. tE^{VI}, dont l'expérience III ne nous a pas permis de décou-

vrir l'origine est bien le B. t. s. 20. En effet, les colonies des B. cE^{VI} et tE^{VI} se trouvaient sur la même plaque de gélatine et nous ne les avons étiquetées comme B. cE^{VI} ou B. tE^{VI} que parce qu'elles avaient un aspect différent.

Expériences V et VI. — Avec les bacilles cE^{VII} et tE^{VII} retirés du mélange après 121 jours de vie commune, nous avons injecté deux nouveaux cobayes.

Ces cobayes ont fourni (même après 7 et 9 semaines) un sérum dépourvu de propriétés agglutinantes à l'égard des B. typhiques ou coli de la selle 20.

Conclusion. — Il nous a donc été impossible de déterminer si les organismes retirés du mélange des B. typhiques et coli de la selle 20, après 121 jours d'existence commune, appartenaient à l'espèce typhique ou à l'espèce côlienne.

L'étude des propriétés agglutinantes du sérum des cobayes auxquels nous avons injecté les bacilles tE^{I}, tE^{II}, tE^{III}, tE^{IV}, tE^{V} nous a permis de démontrer que ceux-ci étaient des descendants du B. typhique de la selle 20. parce que nous avions conservé dans notre collection le B. d'Eberth retiré de la selle 20 qui nous a servi d'étalon. Si cependant nous nous trouvions en présence d'organismes dont nous ne connaîtrions pas la filiation, comme c'est le cas dans l'analyse microbiologique des eaux, où les organismes souches font défaut, comment pourrions-nous décider si un organisme semblable aux bacilles tE^{I}, tE^{III}, etc., etc., qui sont mobiles, qui ne donnent ni gaz ni indol, et ne sont pas agglutinés par le sérum antityphique expérimental, est typhique ou côlien.

On sait depuis longtemps, et nous venons de le démontrer à nouveau, que l'injection réitérée à un cobaye d'un B. typhique donne un sérum agglutinant le B. typhique authentique. La réciproque de cette proposition est-elle vraie? Un sérum agglutinant un bacille typhique authentique provient-il indubitablement de l'injection d'un B. typhique? Cela paraît évident *a priori* : c'est en effet ce qu'affirme le clinicien quand il fait le séro-diagnostic de la fièvre typhoïde. Il admet qu'il y a toxi-infection par le B. d'Eberth quand le sérum du malade agglutine le B. typhique authentique dans des conditions requises. En conséquence, un B. inconnu, présentant les caractères culturaux du B. d'Eberth, doit pouvoir être considéré comme B.

typhique, si le sérum d'un cobaye auquel on l'a injecté agglutine le B. typhique authentique à un titre suffisamment élevé.

Nous avons donc injecté les B. tE^{I}, tE^{II}, tE^{III}, tE^{IV}, etc., etc., aux cobayes, et nous avons recherché après 15 jours le titre agglutinant de leur sérum, en prenant comme étalon le B. typhique Liége.

Pour les injections et la recherche du pouvoir agglutinant, nous avons scrupuleusement suivi les prescriptions que nous avons énumérées antérieurement déjà. Les expériences ont été clôturées après 15 jours[1].

Nous consignons les résultats dans le tableau suivant :

BACILLES injectés.	TITRE agglutinant après 15 jours.	OBSERVATIONS
tE^{I}	1/40	Retiré du mélange neutre après 5 jours.
tH^{I}	1/40	Retiré du mélange acide après 5 jours.
tE^{III}	1/40	Retiré du mélange neutre après 46 jours.
tH^{III}	1/40	Retiré du mélange acide après 46 jours.
tE^{IV}	1/30	Retiré du mélange neutre après 58 jours.
tH^{IV}	1/30	Retiré du mélange acide après 58 jours.
tE^{V}	Néant	Retiré du mélange neutre après 82 jours.
tH^{V}	Néant	Retiré du mélange acide après 82 jours.

CONCLUSION. — L'agglutination par le sérum du cobaye injecté avec les bacilles tE^{I}, tE^{II}, tE^{III}, tE , tE^{IV} est un procédé impuissant pour nous renseigner sur la nature typhique de B. tE^{V}, il est incertain pour B. tE^{IV} ; il constitue un moyen rapide et sûr pour B. tE^{III}, B. tE^{II}, B. tE^{I}.

Les cobayes injectés avec ceux-ci donnent en effet un sérum agglutinant à 1/40 le bacille typhique Liége ; cette dilution est suffisante, car elle équivaut sensiblement au titre agglutinant qu'exige le clinicien pour poser le diagnostic de fièvre typhoïde quand il fait la séro-réaction.

1. Nous avons cru ne pas pouvoir dépasser ce délai, parce que nous visions ici plus spécialement l'analyse bactériologique des eaux.

Pour confirmer cette opinion, nous avons injecté dans le tissu cellulaire sous-cutané des cobayes des cultures en bouillon de B. d'Eberth autres que B. de Liége, et nous avons déterminé après 15 jours le titre agglutinant du sérum vis-à-vis du B. typhique Liége.

BACILLES injectés.	TITRE AGGLUTINANT après 15 jours.	OBSERVATIONS
B. t. s. 20.....	1/50	
B. t. Gand....	1/30 le 8e jour.	Mort le 8e jour de l'expérience.
B. t. s. 22 (1).		Mort le lendemain de l'injection.
B. t. s. 15 (2).		Mort le lendemain de l'injection.

Conclusion. — La plupart des cobayes injectés avec des B. d'Eberth de notre collection meurent avant la fin de l'expérience, avec généralisation du B. typhique dans les organes. Toutefois, le cobaye qui a reçu B. t. s. 20 a donné, après 15 jours, un sérum agglutinant à 1/50, c'est là un titre qui se rapproche beaucoup de celui obtenu par l'inoculation de B. tE^{I}, B. tE^{II}, B. tE^{III}.

Avant de poser les conclusions de ces expériences, il était indispensable de rechercher si le sérum des cobayes injectés avec des B. coli de provenance diverse agglutinait le B. typhique Liége. Le tableau suivant nous renseignera à ce sujet :

1. Bacille d'Eberth retiré de la selle 22. (Voir 1er mémoire.)
2. Bacille d'Eberth retiré de la selle 15. (Voir 1er mémoire.)

BACILLES injectés.	TITRE agglutinant après 15 jours.	OBSERVATIONS
C. Gand	néant.	Cobaye mort après 12 jours.
C. s. 20	néant.	Cobaye mort après le 3e jour.
C. s. 20$_x$	néant.	C'est le c. s. 20 ne donnant plus d'indol après 82 jours de vie en commun avec B. t. s. 20.
C^{I}	néant.	Bacille coli normal retiré de l'eau.
C^{II}	néant.	Coli retiré de l'eau ne donne pas d'indol, mais bien des gaz.
C^{III}	néant (cobaye mort le lendemain de l'injection).	Coli retiré de l'eau ne donne ni gaz, ni indol, cobaye mort le lendemain.
C^{IV}	néant.	Coli retiré de l'eau donne gaz, pas indol.
C^{V}	néant.	Coli retiré de l'eau donne gaz et indol.

Conclusion. — Le sérum de cobaye injecté avec le bacille coli n'agglutine donc pas le B. typhique Liége. En conséquence, l'étude du pouvoir agglutinant du sérum d'un cobaye auquel on a injecté pendant 15 jours (une fois tous les 2 jours) 2 c. c. d'une culture en bouillon âgée de 48 heures, constitue un moyen pratique et sûr pour déterminer la nature typhique de certains bacilles d'Eberth privés de leur sensibilité vis-à-vis des agglutinines du sérum antityphique expérimental. D'autres bacilles qui ne sont pas agglutinés, et qui sont cependant des bacilles d'Eberth, échappent à toute détermination tant par cette méthode que par les moyens de différenciation dont nous disposons actuellement.

Conclusions générales.

Parvenu au terme de la seconde partie de notre travail, nous nous croyons autorisé à formuler les conclusions suivantes :

1° La conception de l'écrasement du B. typhique par le B. coli, soutenue par Wathelet au laboratoire de Malvoz, est infirmée par nos recherches sur l'antagonisme entre ces deux organismes. Cet auteur n'a pas retrouvé le B. typhique dans ses mélanges, non pas parce que ce bacille n'y existait plus,

mais bien parce qu'il s'est placé dans des conditions défavorables pour l'y déceler;

2° La vie en commun peut modifier profondément les propriétés des deux organismes, le bacille typhique perdant ainsi sa sensibité vis-à-vis des agglutinines, le bacille coli étant privé de ses caractères spécifiques (gaz, indol);

3° Très différentes au début des colonies typhiques, certaines colonies côliennes profondes s'en rapprochent insensiblement par leurs dimensions et leur aspect, à partir de la 3e, 4e semaine; elles sont alors franchement bleutées, tandis que les colonies éberthiennes sont blanc bleuté ;

4° L'abaissement de l'énergie vitale des organismes se manifeste non seulement par une diminution de croissance des colonies, mais aussi par un retard dans leur apparition : ceci est surtout vrai pour les colonies typhiques qui, dès la 3e-4e semaine, ne se montrent plus guère que le 4e-5e jour, tandis qu'au début elles apparaissaient le second jour après l'ensemencement;

5° Si l'agglutination d'un bacille, présentant les caractères du B. d'Eberth, par le sérum antityphique expérimental, à un titre élevé, est un moyen suffisant pour nous autoriser à le considérer comme typhique, l'absence de sensibilité vis-à-vis des agglutinines spécifiques ne nous permet pas de rejeter cet organisme du groupe des typhiques;

6° Les bacilles qui possèdent les attributs du B. d'Eberth, mais qui ne sont plus agglutinés par le sérum antityphique expérimental, doivent être considérés comme B. typhiques, si le cobaye auquel on a injecté tous les 2 jours 2 c. c. d'une culture en bouillon âgée de 48 heures, fournit après 15 jours un sérum agglutinant le B. typhique authentique au titre minimum de 1/40;

7° Il peut exister des bacilles d'Eberth authentiques, mais non agglutinés par le sérum antityphique, dont il est impossible de déterminer la nature typhique, tant par le procédé énoncé ci-dessus, que par les moyens de diagnose dont on dispose actuellement.

Recherches sur le traitement des animaux tuberculeux
PAR LA MÉTHODE DE LANDERER
et sur la virulence des bacilles tuberculeux.

PAR LE D[r] E. KROMPECHER (BUDAPEST)

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

I

La base scientifique de la méthode de Landerer[1] dans le traitement de la tuberculose par les préparations de cannelle est constituée par les recherches de Richter, publiées en 1893, dans les *Archives de Virchow*, sous le titre : Recherches histologiques sur l'effet de l'acide cinnamique sur des lapins tuberculeux.

Richter a inoculé 10 animaux par la voie intra-veineuse avec la dilution d'une culture pure de bacilles tuberculeux. — Le mode de préparation de cette dilution ainsi que la quantité du liquide inoculé ne sont pas mentionnés. — Un de ces animaux succomba 13, l'autre 18 jours après l'infection, et c'est après la constatation des lésions pulmonaires plus ou moins étendues de ces animaux que le traitement fut mis à l'épreuve. On a gardé un lapin comme témoin. On s'est servi d'une émulsion à 5 0/0 d'acide cinnamique, dont on injectait dans les veines, chaque fois 0,1, 0,2 grammes, au début, et 0,5 grammes plus tard, l'injection se faisant 2 fois par semaine. Sur les lapins traités de cette façon, 2 succombèrent spontanément : le premier au 19e jour du traitement, après 6 injections; le deuxième, au bout de 7 mois 1/2, d'une pneunomie aiguë. Tous les autres animaux furent sacrifiés sous chloroforme au bout de 6 mois de traitement. Le lapin non traité qui servait de témoin est mort 7 mois après l'infection ; son autopsie n'a pas été faite.

1. *Die Behandlung der Tuberculose mit Zimtsäure, Leipzig*, 1893.

Après une étude soigneuse des changements histologiques observés chez les animaux tuberculeux traités ainsi par l'acide cinnamique. Richter conclut que, sous l'influence du traitement de Landerer, le tubercule, au lieu de suivre son évolution normale, caséification et ramollissement, subit, au contraire, une transformation fibreuse et imprime ainsi une tendance à la guérison. Ainsi l'évolution que suit, sous l'influence du traitement par l'acide cinnamique, la tuberculose inoculée ressemble bien aux processus que nous observons dans les cas d'enkystements de corps étrangers.

Pour la tuberculose péritonéale, Landerer n'a réussi à obtenir la guérison dans aucune de ses séries. Dans 2 séries l'inoculation de cultures tuberculeuses pures demeura sans effet, et, dans une troisième, tous les animaux sont morts dans le courant de 4 semaines, de sorte que le traitement commencé dans la troisième semaine n'a produit presque aucun effet. Les animaux d'une 4e série, inoculés avec des ganglions lymphatiques tuberculeux dans le péritoine, résistèrent à l'infection. Dans une 5e série, les animaux furent d'abord inoculés, dans le péritoine, avec des ganglions tuberculeux mélangés intimement avec une solution de chlorure de sodium; comme la laparotomie exploratrice, faite au bout de 3 semaines, montra un résultat négatif, on procéda à une deuxième inoculation, dans le péritoine, de ganglions tuberculeux triturés. Tous ces animaux périrent dans une période de 4 mois, et, à l'autopsie, les tubercules caséeux paraissaient encapsulés de leucocytes et de tissu fibreux qui pénétraient jusqu'à l'intérieur du tubercule. Les changements histologiques observés, sous l'influence de l'acide cinnamique, chez les animaux de cette 5e série atteints de tuberculose péritonéale expérimentale, sont donc comparables à ceux que Richter obtint par la méthode de Landerer dans le traitement de la tuberculose pulmonaire.

Richter et Spiro[1] ont observé que sous l'influence des injections d'acide cinnamique, chez l'animal et l'homme, — sains ou tuberculeux, — il se produisait des phénomènes de leucocytose avec multiplication notable de globules blancs polynucléaires. Ces

1. Ueber die Wirküng intravenöser Zimmtsäure injectionen aüf das Blut, *Arch. fur experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 1894.

phénomènes sont surtout accentués chez les animaux tuberculeux à la suite d'une injection intra-veineuse: ils atteignent leur maximum 4 heures après l'injection, et reviennent en 24 heures à l'état normal. Malgré des injections répétées durant des mois, à 2-3 jours d'intervalle, on n'a pu obtenir une multiplication durable de leucocytes, une leucocytose chronique pour ainsi dire.

En dehors de ce que les expériences de Richter ne donnent aucun renseignement sur le mode de préparation de l'émulsion qui a servi à l'inoculation, ni sur la quantité du liquide qui a été injecté, elles prètent encore à la critique du fait qu'*un seul animal* fut laissé pour contròle, et qu'elles n'indiquent pas ni l'autopsie ni l'examen histologique de ce témoin unique. — Il est aussi quelque peu surprenant que cet animal de contrôle ne mourût *que* 7 *mois* après l'inoculation intra-veineuse avec des bacilles tuberculeux, puisqu'on sait que les lapins inoculés, par la voie veineuse, avec des bacilles tuberculeux *virulents*, succombent ordinairement 1, 2, ou, tout au plus, 3 mois après l'inoculation, d'une tuberculose généralisée. — On sait d'autre part que les tubercules provoqués par des bacilles affaiblis guérissent spontanément en s'entourant d'une capsule conjonctive (Lôte), et présentent, en un mot, les mêmes changements histologiques que Richter nous trace de la tuberculose traitée au moyen de l'acide cinnamique. Il n'est pas possible de nier, comme cela résulte du fait que l'animal de contròle a survécu 7 mois, et malgré la constatation par Richter de la mort de deux lapins au 13e et au 18e jour, que l'infection primitive ne fût pas trop grave; mais il y a encore en outre à se demander si les animaux traités n'auraient pas pu, comme l'animal témoin, continuer à vivre pendant 6 mois, même sans avoir subi un traitement par l'acide cinnamique, et si l'animal de contròle n'aurait pas pu présenter les mêmes processus histologiques que les animaux traités.

Bref, la série de recherches de Richter n'est pas sans reproches, et laisse fortement soupçonner que la culture dont il s'est servi n'était pas assez virulente, et que les changements histologiques attribués à l'effet de l'acide cinnamique n'étaient que le résultat de la tendance naturelle à la guérison que présentent les tubercules produits par des bacilles affaiblis. — Cette manière

de voir trouve encore sa confirmation dans cette remarque de Landerer, que les animaux inoculés, dans le péritoine, avec des bacilles virulents, moururent dans 4 semaines, de sorte que le traitement commencé déjà à la fin de la 3e semaine est resté « presque sans effet ».

Il en est de même des expériences de la 5e série, dont nous avons parlé plus haut.

Il ne faut pas oublier que les animaux de cette série ont été inoculés une première fois avec des ganglions tuberculeux dont l'effet, d'après la laparotomie exploratrice, n'était pas encore visible au bout de 3 semaines, et que les formations fibreuses et l'enkystement, qui ont suivi la deuxième inoculation et son traitement, pouvaient très bien tirer leur origine des tubercules de la première inoculation avec des bacilles affaiblis. Il pouvait donc s'agir ici encore du résultat d'une tendance spontanée, naturelle.

Pour savoir si d'un côté les animaux traités par l'acide cinnamique acquièrent une immunité contre la tuberculose, et si de l'autre, chez les animaux inoculés avec des bacilles tuberculeux virulents, la maladie a une marche plus lente et présente les transformations histologiques décrites par Richter, nous avons traité des animaux pendant un temps variable par l'acide cinnamique, et les avons inoculés ensuite avec des bacilles tuberculeux virulents ; nous avons aussi traité par l'acide cinnamique des animaux inoculés préalablement avec des bacilles tuberculeux virulents. Chaque fois, le nombre des animaux de contrôle était égal à celui des animaux soumis à l'expérience.

Nous avons employé, pour le traitement, la solution, faiblement alcaline, stérilisée, de cinnamate de soude à 4 0/0, qui a été dernièrement recommandée par Landerer à la place de l'acide cinnamique. Les lapins furent inoculés par la veine de l'oreille, les cobayes dans le péritoine ou sous la peau. Pour l'inoculation des animaux, — ceux qui ont été préalablement traités ainsi que ceux sur lesquels nous avons voulu étudier l'action thérapeutique du cinnamate de soude, — nous avons employé une culture pure du bacille tuberculeux humain, âgée de 3 semaines. 3 prises de cette culture avec un fil de platine, ce qui fait 3 milligrammes environ, furent déposées dans 10 c. c. d'eau stérilisée et mélangées intimement jusqu'à la formation d'une émulsion

fine, 0,5 c. c. ou 0,15 milligrammes de cette émulsion sont inoculés par voie veineuse, péritonéale ou sous-cutanée. Tous les animaux sont inoculés avec une culture de même âge.

Les animaux de contrôle inoculés de cette façon, dans la veine ou dans le péritoine, succombèrent en général 1 à 2 mois plus tard, très amaigris, d'une tuberculose généralisée. — Les cobayes inoculés par la voie sous-cutanée présentèrent des ulcérations tuberculeuses bien prononcées, aux points où avait été faite la piqûre, déjà dès la 2e semaine après l'inoculation, et dès la 3e semaine il survint chez eux une tuméfaction des ganglions lymphatiques de la région. — Dans la majorité des cas, la tuberculose ainsi inoculée amenait rapidement un fort amaigrissement, et la mort au bout de 3 mois.

Les détails qui concernent les animaux de contrôle sont indiqués dans le tableau suivant :

ANIMAL	INFECTION	MODE d'infection.	MORT	EXAMEN HISTOL. PATHOL.
Lapins	1899, XII, 15	voie intra-veineuse	13 jours	Tubercules microscopiques dans les poumons, le foie et la rate.
—	1899, XII, 16	—	15 —	— —
—	—	—	23 —	Tubercules des poumons visibles à l'œil nu, rate augmentée de volume.
—	—	—	25 —	— —
—	1899, XII, 2	—	30 —	Tuberculose généralisée bien accentuée.
—	—	—	48 —	— —
Cobayes	1899, XII, 16	voie intra-péritonéale.	23 —	Début d'une tuberculose miliaire. La rate grosse.
—	1899, XI, 15	—	50 —	Tuberculose généralisée prononcée.
—	1900, I, 8	—	58 —	— —
—	1900, II, 3	voie sous-cutanée.	sacrifié 25 jours	Ulcère tuberculeux au point d'inoculation. Tuberculose péritonéale.
—	—	—	mort 75 jours	Tuberculose généralisée.
—	—	—	25 —	Ulcère tuberculeux au point d'inoculation et ganglions tuméfiés.

Afin de résoudre *la première question : si les préparations cinnamiques sont capables de donner l'immunité contre la tuberculose ou si elles ont une influence quelconque sur la marche de la maladie*, j'ai administré, pendant des semaines et des mois, du cinnamate de soude aux animaux que j'ai inoculés secondairement avec des bacilles tuberculeux. L'injection se faisait 1 à 2 fois par semaine, en moyenne. Les lapins recevaient chaque fois dans les veines de 10 à 40 centigrammes, dose qu'ils supportaient facilement sans aucune suite fâcheuse. Des doses plus élevées, de 60 à 80 centigrammes, causèrent dans 1-2 cas la mort des lapins, de sorte que je dus m'en abstenir. Pour les injections aux cobayes, je fis usage d'une solution à 2 0/0; chaque injection était de 10 à 20 centigrammes. Des solutions concentrées à 4 0/0 amenèrent dans plusieurs cas la mort par une syncope cardiaque réflexe.

Le tableau suivant nous indique la manière dont se comportaient vis-à-vis de la tuberculose les animaux traités préventivement comme nous venons de l'indiquer.

ANIMAL	DÉBUT du traitement.	DURÉE	QUANTITÉ	Mort après l'inoculation avec bac. tub.	EXAMEN HISTOL. PATHOL.
Lapins	1899, IX, 27	80 jours	190 cgm.	9 jours	Hyperémie des poumons. — Infarctus hémorrhagiques abondants. — Tuberculose microscopique.
—	—	80 —	315 —	30 —	Tuberculose généralisée bien avancée.
—	1899, IX, 7	100 —	230 —	48 —	— —
Cobayes	1899, IX, 8	98 —	197 —	23 j. (Infect. par voie intrapériton.)	— —
—	—	121 —	247 —	19 j. (Infect. par voie intrapériton.)	— —

Il résulte de ces expériences que les animaux soumis au traitement pendant une période variant de 2 1/2 *à* 4 *mois, et qui ont reçu du cinnamate de soude en quantité variant de* 190 *à* 315 *centigrammes, succombaient à la tuberculose* 1 *à* 2 *mois après l'inoculation, c'est-à-dire dans le même temps et dans les mêmes conditions cliniques et patho-*

logiques que les animaux de contrôle. Le cinnamate de soude non seulement n'a donné, dans aucun cas, de l'immunité, mais n'a même eu aucune influence retardatrice sur la marche de la maladie.

Pour répondre à la deuxième question se rapportant à *l'effet thérapeutique du cinnamate de soude chez des animaux tuberculeux*, j'inoculai, d'après le mode indiqué plus haut, des lapins et des cobayes avec des bacilles de la tuberculose : le traitement commençait 2, 8, 14, 21, 28 jours plus tard. L'injection de cinnamate de soude, en dose de 10-15 centigrammes, se faisait régulièrement 2 fois par semaine. Le tableau suivant indique la marche de la tuberculose chez les 10 animaux traités.

ANIMAL	INOCULATION tuberculeuse.	DÉBUT du traitement ap. l'infect.	QUANTITÉ	MORT après l'infection.	EXAMEN PATHOLOGIQUE
Lapin	1899, XII, 16	2 jours	20cgs	12 jours	Une forte hyperémie aux poumons. Grosse rate. Tuberculose microscopique.
—	1900, I, 15	2 —	85	28 —	Tuberculose des poumons visible microscopiquement. Tuberculose miliaire du foie et de la rate. Cette dernière est très volumineuse.
—	1899, XII, 2	14 —	20	23 —	—
—	1899, XII, 16	21 —	20	30 —	—
—	—	21 —	48	50 —	—
Cobaye	1900, I, 27 (voie sous-cutanée)	2 —	10	6 —	Péritonite streptococcique.
—	1900, I, 9 (voie sous-cutanée)	8 —	40	24 —	Ulcération tuberculeuse au point d'inoculation : ganglions de la région tuméfiés, péritonite tuberculeuse. Rate très volumineuse.
—	—	8 —	100	80 —	Tuberculose généralisée bien avancée.
—	—	14 —	16	23 —	Tuberculose péritonéale et pulmonaire.
—	1899, XII, 16 (voie sous-cutanée)	21 —	110	74 —	Tuberculose avancée.
—	—	21 —	120	91 —	—
—	1899, XI, 15 (v. intrapéritoné.)	28 —	94	56 —	—

Comme on le voit, les animaux traités avec du cinnamate de soude à partir du 2e, 8e, 14e, 21e et 28e jour après l'inoculation tuberculeuse, succombaient, en moyenne, 1 à 3 mois plus tard, à la tuberculose tout aussi bien que les animaux témoins.

Ni macro ni microscopiquement on ne pouvait découvrir de processus tendant à la guérison comme la transformation fibreuse et l'enkystement.

La seule chose que j'aie pu constater chez les lapins sains ainsi que chez les lapins tuberculeux, après l'injection intra-veineuse de cinnamate de soude, c'est la multiplication du tissu qui forme le stroma des poumons. Les cellules du tissu conjonctif, surtout les cellules endothéliales, paraissaient fortement proliférées et montraient par-ci et par-là des figures de karyokinèse.

J'ai aussi observé des changements pareils dans les poumons de lapins qui, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, ont été inoculés dans les veines avec des bacilles virulents — vivants ou morts — de la tuberculose humaine et de la tuberculose des poissons; ces changements étaient toujours localisés aux poumons. En présence de ces faits, il m'est impossible d'attribuer cette *pneumonie interstitielle* à une action particulière de l'acide cinnamique, et je penche à la considérer comme le résultat de l'action mécanique et chimique de la solution ou de l'émulsion.

J'ai pu constater la réalité des indications de Richter, de Spiro et Landerer sur l'*action physiologique* de l'acide cinnamique : 3 à 4 heures après l'injection intra-veineuse survient une *leucocytose* active qui disparaît 24 heures après. Malgré un traitement prolongé pendant 2 mois 1/2, durant lequel le lapin sain soumis à l'expérience a reçu 500 centigrammes environ de cinnamate de soude, je n'ai pas pu découvrir chez l'animal en question aucun autre changement histologique ou pathologique que celui que nous venons de décrire sous le nom de pneumonie interstitielle. L'animal avait augmenté de poids, l'urine est restée normale. Il est encore un point remarquable, c'est la coloration rouge intense, l'hyperémie de la moelle des os, que je trouvais toujours moins prononcée chez les animaux qui n'avaient pas subi l'influence de l'acide cinnamique. Ce phénomène, me semble-t-il, doit être mis en relation avec la prolifération des leucocytes.

Nous pouvons donc résumer les résultats de nos expériences comme suit :

Les animaux traités par le cinnamate de soude en injections intraveineuses présentent, 3 à 4 heures après l'injection, une leucocytose très accusée et une hyperémie de la moelle osseuse : le stroma des poumons, obéissant, il semble, à l'action mécanique et chimique du liquide de l'injection, est augmenté d'une façon appréciable : les animaux, du reste, se portent bien et peuvent augmenter de poids.

Le traitement préventif avec le cinnamate de soude ne donne aucune immunité aux animaux contre l'infection par des bacilles tuberculeux virulents.

Les animaux appropriés, inoculés avec des bacilles tuberculeux virulents, succombent à la tuberculose, malgré le traitement par le cinnamate de soude, aussi bien et aussi rapidement que les animaux témoins.

Des processus tendant à la guérison ne s'observent nulle part chez les animaux inoculés avec des bacilles tuberculeux virulents.

Ces expériences de contrôle, ainsi que le fait que le seul animal témoin de Richter resta vivant pendant 7 mois, suffisent largement pour démontrer que Richter s'était servi, pour l'inoculation des animaux et pour ses expériences, de bacilles tuberculeux affaiblis à virulence insuffisante, et qu'il avait attribué à l'acide cinnamique la guérison qui n'était que le résultat d'une tendance spontanée, naturelle.

II

Je crois pouvoir conclure des recherches que je viens de décrire que *Richter*, qui a le premier expérimenté les préparations cinnamiques sur des lapins tuberculeux, s'était servi pour l'inoculation de ses animaux de bacilles trop peu virulents, puisque l'animal de contrôle lui-même est resté vivant pendant 7 mois. A cette occasion, j'ai entrepris une série d'expériences ayant pour but de rechercher la virulence de différents bacilles tuberculeux. Mes expériences ont porté en tout sur 7 cultures : 3 cultures empruntées à la tuberculose des mammifères, 3 à la tuberculose des oiseaux et 1 à la tuberculose des poissons. Dans la supposition que les modifications provoquées par les bacilles seraient d'autant plus différentes que la différence de la virulence elle-même de ces bacilles est plus grande,

j'instituai des recherches systématiques, principalement avec une culture *très virulente*, une autre de *virulence nulle*, des bacilles tuberculeux humains, et une culture des *bacilles tuberculeux des poissons*. L'émulsion destinée à l'inoculation fut préparée de la façon suivante : un fil de platine fut plongé à trois reprises dans une culture vieille de 2-3 semaines, et fut ensuite introduit, après chaque immersion dans la culture, dans 10 c. c. d'eau stérilisée. Les trois prises avec le fil de platine égalant approximativement 3 milligrammes de culture, chaque c. c. de cette émulsion contenait 0,3 milligrammes environ de bacilles tuberculeux. Chaque injection contenait, suivant les circonstances, de 1/4 à 10 c. c., c'est-à-dire de 0,1 à 3 milligrammes. L'inoculation aux lapins se faisait d'ordinaire par voie intra-veineuse ; elle se faisait, chez les cobayes, par voie intra-péritonéale ou sous-cutanée. Quelques semaines après l'injection de bacilles vivants ou morts dans la veine de l'oreille, on trouvait constamment une pneumonie interstitielle plus ou moins prononcée. Celle-ci est certainement le résultat de l'action mécanique et chimique que l'émulsion exerce sur les tissus pulmonaires ; cela paraît d'autant plus vraisemblable que j'ai observé les mêmes modifications chez des animaux auxquels j'injectais dans la veine de l'oreille de l'acide cinnamique, sans que la multiplication du tissu conjonctif se retrouve quelque part ailleurs.

Comme j'avais supposé que les bacilles tuberculeux, de virulence différente, sont capables de provoquer des modifications différentes suivant le degré de leur virulence, et cela même si l'on opère avec des cultures *tuées* par la chaleur, et comme on pouvait s'expliquer ainsi comment certains auteurs obtenaient, en opérant avec des bacilles *morts*, des tubercules sans caséification, d'autres des tubercules caséifiés, je fis des expériences aussi avec des bacilles morts, mais de différents degrés de virulence. Pour voir enfin si d'une part les animaux inoculés avec des bacilles de virulence différente réagissent avec une intensité égale contre une tuberculine active, et si, d'autre part, les bacilles d'une virulence inégale donnent aussi des tuberculines d'effet variable, j'étudiai d'abord la manière dont se comportent vis-à-vis d'une tuberculine active les animaux inoculés avec des bacilles inégalement virulents ; j'étudiai ensuite comment agissent sur les animaux tuberculeux les tuberculines

préparées avec des bacilles de différents degrés de virulence.

Les questions auxquelles je me propose ainsi de répondre sont donc les suivantes :

I. *Quelles sont les modifications cliniques, pathologiques et histologiques que provoquent les bacilles tuberculeux vivants de virulence différente, bacilles de la tuberculose humaine très virulents et sans virulence, bacilles de la tuberculose des poissons ?*

II. *Même question pour les bacilles tués par la chaleur ;*

III. *Comment se comportent les animaux inoculés avec ces trois variétés de bacilles, soit à l'état vivant, soit à l'état mort, vis-à-vis de la tuberculine ;*

IV. *Comment réagit sur les animaux tuberculeux la tuberculine préparée avec une de ces trois variétés de bacilles.*

*
* *

I. *Modifications cliniques, pathologiques et histologiques provoquées par les bacilles vivants de la tuberculose humaine — très virulents et de virulence nulle — et par ceux de la tuberculose des poissons.*

1° Le bacille tuberculeux, *très virulent*, pris dans un ganglion inguinal d'un cobaye tuberculeux, tuait des lapins en inoculation intra-veineuse déjà au bout de 13 à 23 jours; les cobayes, en inoculation intra-péritonéale au bout de 6 à 8 semaines ; la qualification *très virulent* n'était donc pas exagérée ;

2° Le bacille tuberculeux humain *non virulent* se trouvait depuis 6 *ans sans interruption dans des milieux artificiels.* Durant ce temps, la culture avait pris peu à peu les caractères rappelant celle de la *tuberculose aviaire;* elle se ramollissait, devenait plus liquide, et formait, sur la gélose, quelques semaines après l'ensemencement,de gros plis, de sorte qu'elle rappelait sous beaucoup de rapports la culture du bacille mésentérique.

Il faut remarquer que ce bacille non virulent ou avirulent *poussait encore à la température de* 15° *à* 20°, mais faiblement et lentement. Chez des bacilles en culture sur gélose depuis plusieurs semaines, je trouvais constamment les *ramifications* et les *formations en massue* décrites pour la première fois par *Metchnikoff ;* je n'en trouvais pas dans des cultures sur pommes de terre, mais je rencontrais ici souvent des bâtonnets gros et courts, en

forme de chaîne principalement, au moment de l'apparition des spores, qui ressemblent beaucoup aux bacilles de Löffler.

Les résultats d'expériences sur l'inoculation de ces bacilles *avirulents* aux animaux sont indiqués dans le tableau suivant :

ANIMAL	INOCULATION	MORT	POIDS	RÉSULTATS de l'autopsie	MODIFICATION MICROSCOPIQUE
A *Lapin* (1990 gr.)	1899, X, 4 1,5 c. c. voie intrav.	Sacrifié après 17 *jours*	—	*Négatif*	*Dans les poumons, le foie et la rate des tubercules miliaires peu nombreux constitués par 1-2 cellules géantes ne contenant que peu de bacilles tuberculeux, et par des leucocytes peu nombreux ; pas de caséification.*
B *Lapin* (1820 gr.)	—	Sacrifié après 40 *jours*	460 gr. d'aug^{n}.	—	*Comme chez A, toutefois l'infiltration des leucocytes est encore moins accusée ; pas de caséification.*
C *Lapin* (1810 gr.)	—	Sacrifié après 79 *jours*	830 gr. d'aug^{n}.	—	*Comme chez A et B, l'infiltration des leucocytes presque absente ; pas de caséification.*
D *Lapin* (1870 gr.)	1900, I, 8 1,5 voie intrav.	Sacrifié après 16 *jours*	—	—	Comme chez A.
A *Cobaye*	1900, I, 8 1 c. c. voie intrap.	Sacrifié après 23 *jours*	Augmentation de poids plus ou moins accusée.	*Négatif*	*Quelques cellules géantes disséminées non caséifiées dans le foie et la rate ; la plupart se montrent dépourvues de bacilles.*
B *Cobaye*	—	Sacrifié après 42 *jours*		Un tubercule caséeux gros comme une lentille au point d'inoculation. Pour le reste, négatif.	— —
C *Cobaye*	1900, I, 8 2 c. c. dans le périt 0,5 c. c. sous la peau	Sacrifié après 46 *jours*		*Négatif*	— —
D *Cobaye*	1900, II, 24 2 c. c. dans le périt. 0,5 c. c. sous la peau	Sacrifié après 15 *jours*			— —

Comme on voit, *les lapins et les cobayes inoculés avec des quantités d'émulsion variant de* 1 *à* 2,5 *c. c. soit par voie intra-veineuse, soit*

par voie intra-péritonéale et sous-cutanée, sont restés complètement sains pendant une période variant de 15 à 79 jours, et ont même manifesté une augmentation de poids appréciable.

Un seul cobaye (B) a présenté, au niveau du point de l'inoculation, un tubercule caséeux gros comme une lentille, et il est certain que la lésion locale des tissus a dû favoriser son évolution.

Tous les animaux ont montré un état normal de santé pendant la vie et à l'autopsie; au microscope on constatait chez les lapins dans les poumons, le foie et la rate, chez les cobayes dans le foie et la rate, quelques cellules géantes disséminées, non caséeuses, contenant des bacilles tuberculeux rares et facilement colorables; les cellules géantes étaient entourées d'une zone infiltrée de leucocytes peu nombreux qui ont disparu déjà au bout de 1 à 2 mois. En raison de ces modifications histologiques minimes, sans aucune influence manifeste sur la santé des animaux, j'ai désigné les bacilles tuberculeux en question du qualificatif « avirulents ».

3° Le *bacille tuberculeux des poissons* qui a été isolé par *Bataillon, Dubard et Ferré*[1] d'une tumeur de la paroi abdominale de la carpe, ne donnait les ramifications décrites par *Kral et Dubard* que sur la gélose; cultivé sur la pomme de terre, il se présente sous forme de bâtonnets gros et courts, en forme de chaîne, ressemblant un peu au bacille de la diphtérie. Les animaux inoculés avec ce bacille ont donné les résultats indiqués dans le tableau ci-après.

Comme on va le voir, *les animaux inoculés avec le bacille tuberculeux des poissons, soit par voie intra-veineuse, soit par voie intra-péritonéale et sous-cutanée, ont continué à se bien porter, et les organes des animaux sacrifiés dans la période de 15 à 48 jours n'ont montré que des modifications histologiques légères consistant, principalement, dans l'apparition en des points différents des cellules géantes, ne contenant que peu de bacilles tuberculeux et entourées de rares leucocytes; pas de dégénérescence caséeuse.*

Si l'on compare maintenant les modifications *provoquées chez des animaux expérimentés par ces différents bacilles, on s'aperçoit vite qu'il y a d'un côté une grande différence entre les lésions provoquées par le bacille tuberculeux humain très virulent et celles provo-*

1. Un nouveau type de tuberculose, *Comp. rend. de la Soc. de Biologie*, 1897.

ANIMAL	INOCULATION	MORT	POIDS	AUTOPSIE	MODIFICATIONS MICROSCOPIQUES
A *Lapin* (1870 gr.)	1900, I, 2 2 c. c. voie intrav.	Mort après 7 *jours*	—	Péritonite granuleuse particulière causée par un bacille contenant des spores	Modification dans le parenchyme des viscères peu appréciables.
B *Lapin* (2040 gr.)	—	Sacrifié après 20 *jours*	—	*Négatif*	*Les poumons, le foie et la rate présentent en différents points des cellules géantes entourées par quelques leucocytes et contenant peu de bacilles; pas de dégénérescence caséeuse.*
C *Lapin* (1900 gr.)	—	Sacrifié après 40 *jours*	440 gr. *d'aug*n de poids	—	— —
A *Cobaye*	1900, I, 2 1 c. c. intrap. 0,5 c.c. sous-cutané	Sacrifié après 15 *jours*	Augmentation de poids plus ou moins prononcée.	*Négatif*	*Des cellules géantes typiques disséminées dans le foie et dans la rate; pas de dégénérescence caséeuse.*
B *Cobaye*	—	Sacrifié après 48 *jours*		—	— —
C *Cobaye*	1900, II, 3 2 c. c. intrap. 0,5 c.c. sous-cutané	Sacrifié après 30 *jours*		—	— —

quées par le B. tuberculeux humain avirulent, et que, de l'autre, les lésions provoquées par le bacille tuberculeux humain avirulent, et celles provoquées par le bacille tuberculeux des poissons sont complètement identiques. Le bacille tuberculeux très virulent engendre la maladie tuburculeuse et amène la caséification des tubercules; le bacille tuberculeux avirulent ainsi que le bacille tuberculeux des poissons laissent au contraire intacte la santé apparente des animaux, et se bornent à la production de quelques modifications microscopiques légères caractérisées par l'apparition des quelques cellules géantes disséminées entourée de cellules rondes d'infiltration peu nombreuses.

Cependant Löte[1], qui, le premier, s'était servi dans ses recherches de bacilles qui, primitivement très virulents, ont été notablement affaiblis dans leur virulence par une culture dans

1. *Orvosi hetilap*, 1889.

un milieu artificiel pendant plusieurs années, avait bien réussi à provoquer par l'inoculation soit intra-veineuse, soit intra-péritonéale, de ces bacilles affaiblis, des *tubercules* partiellement encapsulés et *visibles à l'œil nu*. Il faut donc admettre que la culture dont s'était servi Lote *était encore plus virulente que la nôtre*. Il en est de même de la culture du bacille aviaire dont Courmont et Dor [1] s'étaient servis pour provoquer chez des lapins, par des injections intra-veineuses, des arthrites tuberculeuses correspondant à la *tumeur blanche;* cette culture devait être notablement plus virulente que la nôtre puisque, injectée en quantité de 3 à 6 c. c., elle amenait la mort par tuberculose généralisée.

Qu'à côté des bacilles tuberculeux affaiblis *artificiellement* par une longue culture dans un milieu artificiel, il existe chez des sujets malades des bacilles d'une faible virulence *naturelle*, cela résulte en outre des recherches intéressantes de *Vagedes* [2].

II. *Action des bacilles tuberculeux tués par la chaleur.*

L'émulsion préparée avec chacun des 3 bacilles tuberculeux en question et dont nous avons décrit le mode de préparation plus haut, fut placée pendant 1/2 heure dans le bain-marie en ébullition et chauffée ensuite pendant 1/2 heure dans l'autoclave à 120°. Étant donné que, d'après Grancher, Ledoux-Lebard [7] et *Forster* [8], le bacille tuberculeux meurt en quelques minutes à 70° et en une minute à 95°, il est hors de tout doute qu'ils ont été complétement détruits par la chaleur de 120°. D'ailleurs tous les milieux glycérinés ensemencés avec ces émulsions sont restés complètement stériles.

I. Le bacille tuberculeux *très virulent, essayé sur des animaux après l'action de la chaleur*, a donné les résultats suivants :

1. De la production, chez le lapin, de tumeurs blanches expérimentales par l'inoculation intraveineuse de bacilles tuberculeux. Paris 1891.

2. *Zeitschr. f. Hyg.* 1898.

ANIMAL	INOCULATION	MORT	POIDS	AUTOPSIE	MODIFICATIONS MICROSCOPIQUES
A *Lapin* (1,970 gr)	1899, XII, 29 1 c. c. v. intraveineuse	Mort après 6 *jours*		Depuis 3 j. Un *abcès de la grosseur d'une lentille* au point d'inoculation. Péritonite streptococcique suppurée.	Dans les poumons, *des tubercules* disposés au voisinage des veines et constitués par *des leucocytes polynucléaires;* ces derniers sont en voie de décomposition et contiennent, ainsi que les cellules endothéliales et l'épithélium alvéolaire, de nombreux bacilles tuberculeux bien colorables. Des tubercules semblables dans le foie.
B *Lapin* (1,860 gr)	1899, XII, 29 8 *c. c.* v. intraveineuse	Sacrifié après 9 *jours*	360 *gr. de perte* de poids.	Un abcès au point d'inoculation comme chez A. *Le reste négatif.*	—
C *Lapin* (1,800 gr)	1899, XII, 29 5 *c. c.* v. intraveineuse	Sacrifié après 15 *jours*	130 *gr. de perte* de poids.	Abcès au point d'inoculation comme chez A. Des infarctus isolés dans les poumons. La rate un peu volumineuse.	*Dans les poumons, des tubercules nombreux ramollis à leur centre, et constitués par des cellules géantes et des cellules épithélioïdes. Ces tubercules se sont développés autour des amas de bacilles tuberculeux qui bouchent la lumière des petites veines, se colorent bien, et sont entourés d'une zone de tissu caséifié.*
D *Lapin* (1,850 gr)	1899, XII, 29 1 *c. c.* v. intraveineuse	Sacrifié après 24 *jours*	260 *gr. de perte* de poids.	Abcès au point d'inoculation comme chez A. *Dans les poumons, des tubercules miliaires transparents, nombreux, entourés de foyers hémorragiques.* Rate un peu volumineuse.	Tubercules caséifiés comme chez C; la caséification toutefois est ici plus accusée. (Les cobayes inoculés dans le péritoine avec une émulsion préparée de la matière tuberculeuse de ces poumons sont restés sains.)
A *Cobaye*	1899, XII, 29 2 *c. c.* v. intrapéritonéale	Mort après 4 *jours*		Un abcès de la grosseur d'une lentille au point d'inoculation depuis 3 jours. Tout le poumon droit est farci d'infarctus hémorragiques.	Des modifications *insignifiantes dans les parenchymes viscéraux.*
B *Cobaye*	1899, XII, 29 1 *c. c.* v. intrapéritonéale	Sacrifié après 12 *jours*		Abcès au point d'inoculation comme chez A. Le reste négatif.	—
C *Cobaye*	1899, XII, 29 4 c. c. v. péritonéale	Sacrifié après 18 *jours*	30 *gr. d'augmentation* de poids.	—	

Comme le montrent ces expériences, *le bacille très virulent tué à 120° provoquait, chez des lapins inoculés avec des quantités variant*

de 1 à 8 c. c., déjà au bout du 15e jour après l'inoculation, la formation de foyers caséeux typiques avec des cellules géantes et des bacilles tuberculeux bien colorables. Tous les animaux présentaient une diminution de poids plus ou moins prononcée. Les cobayes inoculés avec des quantités d'émulsion variant de 1 à 4 c. c, étaient trouvés sains même après 48 jours. Il se formait au 3me jour chez tous les animaux, au point d'inoculation, un abcès qui ne contenait pas d'autres microoganismes que les bacilles tuberculeux, et qui disparaissaient au bout de une à deux semaines.

II. L'expérimentation animale avec des *avirulents tués à 120* a donné les résultats suivants :

ANIMAL	INOCULATION	MORT	POIDS	AUTOPSIE	MODIFICATIONS MICROSCOPIQUES
A *Lapin* (1560 gr.)	1899, X, 11 2 *c. c.* v. intraveineuse	sacrifié après 18 *jours*	—	*négatif*	*négatif*
B *Lapin* (2065 gr.)	1899, X, 11 10 *c. c.* v. intraveineuse	sacrifié après 41 *jours*	—	—	—
C *Lapin* (1930 gr.)	1899, X, 11 3 *c. c.* v. intraveineuse	sacrifié après 42 *jours*	—	—	—
D *Lapin* (2110 gr.)	1899. X, 11 8 *c. c.* v. intraveineuse	sacrifié après 74 *jours*	270 *gr. d'augmentation* de poids	—	—
A *Cobaye*	1899, X, 11 1 *c. c.* v. intrapériton.	sacrifié après 10 *jours*	Augmentation de poids plus ou moins accusée.	*négatif*	*négatif*
B *Cobaye*	1899, X, 11 2 *c. c.* v. intrapériton.	sacrifié après 30 *jours*		—	—
C *Cobaye*	1899, X, 11 5 *c. c.* v. intrapériton.	sacrifié après 106 *jours*		—	—
D *Cobaye*	1899, X, 11 2 *c. c.* v. intrapériton.	sacrifié après 153 *jours*		—	—

Comme nous le montre ce tableau, *tous les animaux soumis à l'inoculation avec des bacilles avirulents tués, et qui ont reçu des quantités d'émulsion variant de 1 à 10 c. c. par les différentes voies, intra-*

veineuse, intra-péritonéale et sous-cutanée, sont restés sains. On n'a pu constater aucune modification, même au microscope.

III. Les inoculations avec des bacilles *tuberculeux des poissons tués* ont donné les résultats suivants :

ANIMAL	INOCULATION	MORT	POIDS	AUTOPSIE	MODIFICATIONS MICROSCOPIQUES
A *Lapin* (1820 *gr.*)	1900, I, 25 2 *c. c.* v. intraveineuse	sacrifié après 14 *jours*	120 *gr. d'augmentation*	*négatif*	*négatif*
B *Lapin* (1760 *gr.*)	1900, I, 25 4 *c. c.* v. intraveineuse	sacrifié après 37 *jours*	330 *gr. d'augmentation*	—	—
A *Cobaye*	1900, I, 25 1 *c. c.* s. la peau 1 *c. c.* d. le périt.	sacrifié après 48 *jours*	150 *gr. d'augmentation*	*négatif*	*négatif*
B *Cobaye*	—	—	150 *gr. d'augmentation*	—	—

Ainsi les animaux soumis à *l'inoculation de 2 à 4 c. c. d'émulsion préparée avec des bacilles tuberculeux de poissons tués, sont restés complètement sains. Ni à l'autopsie, ni au microscope on ne trouve de modifications quelconques.*

Il ressort donc de ces expériences avec des bacilles tuberculeux tués que, dans ce cas encore, les modifications provoquées par l'inoculation de ces bacilles sont différentes, suivant le degré de la virulence. C'est ainsi que les animaux inoculés par voie intraveineuse avec *des bacilles tuberculeux humains très virulents tués,* présentent des tubercules typiques à cellules géantes, à l'état caséeux, et visible, à l'œil nu *déjà au bout de la 3me semaine*, et, dans le cas d'inoculation sous-cutanée, *des abcès*, au bout du 3me jour, tandis que des animaux inoculés *avec des bacilles tuberculeux humains avirulents tués, ou avec des bacilles tuberculeux des poissons tués donnent des résultats négatifs à l'examen microscopique et macroscopique.*

Depuis les expériences de Koch[1] sur la formation d'abcès par

inoculation sous-cutanée de bacilles tuberculeux tués, et celles de Prudden et Hoddenpyl[2] sur la formation de tubercules non caséifiés dans les poumons par inoculation intra-veineuse de la même substance, beaucoup d'autres expériences analogues ont été entreprises par différents investigateurs, qui opéraient soit sur le *bacille tuberculeux humain* (Abel[3], Straus et Gamaleïa[4], Masur[5], Kelber[6], Fokker[7]), soit sur le *bacille tuberculeux des oiseaux* (Grancher et Ledoux-Lebard).

Tantôt des bacilles étaient bouillis pendant plusieurs heures ou à plusieurs reprises, tantôt ils étaient stérilisés dans l'autoclave à 115°-130° durant 10-15 minutes ; ils étaient ensuite injectés à l'animal, dans les veines, le péritoine ou sous la peau. Tous les auteurs s'accordent à reconnaître que les injections intra-veineuses avec ces bacilles morts sont suivies de formation, dans les poumons principalement, de tubercules identiques au follicule tuberculeux à cellules géantes, mais leurs opinions se partagent sur le point de savoir quel est le sort ultérieur de ce tubercule. Les uns (Vissmann[8], Abel) y décrivent des transformations fibreuses, c'est-à-dire *la guérison ;* les autres (Straus et Gamaleïa, Grancher et Ledoux-Lebard), *une nécrose centrale, c'est-à-dire la caséification typique.* — La tuberculose suivie de caséification produite par le bacille mort est désignée par Grancher et Ledoux-Lebard, comme une *nécro-tuberculose.*

D'après l'opinion générale des auteurs, les bacilles tuberculeux tués par la chaleur contiennent une toxine qui devient libre après la destruction du bacille et qui se fixe au protaplasma des bacilles tuberculeux.

En me basant sur les résultats de mes expériences, je dois me ran-

1. Weitere Mittheilüngen über ein Heilmittel, *Deutsche med. Wochenschrift.* 1890.
2. Studies on the action of Dead Bacteria in the Living Body, *New-York med. Journal*, 1891.
3. Ueber die Wirkùng abgetodteter Tuberkel bacillen auf die Lunge von Kaninchen bei Infektion in die Trachea, *Deutsche med. Wochenschr.*, 1892.
4. Contribution à l'étude du poisson tuberculeux, *Arch. de méd. expér. et d'anatomie pathol.* 1892.
5. Zur Kenntniss von der Wirküng todter Tuberkelbacillen, *Ziegler's Beitrage zur pathol. Anait.*, 16.
6. Ueber die Wirküng todter Tuberkelbacillen, *Arbeiten aus dem pathol. anat. Institut zu Tübingen*, 1899.
7. De werking von doode Tuberkelbacillen. *Nederlaudisch, Tyaschrift voor Geneeskunde*, 1892.
8. Wirküng toter Tuberkelbacillen auf den thierischen Organismus. *Virch. Arch.* 1129.

ger de l'avis des auteurs français, et admettre la réalité du fait qu'un bacille tuberculeux très virulent, tué par une chaleur de 120°, *peut encore provoquer la formation de tubercules caséifiés, typiques.*

Mais tandis que certains auteurs (Gamaleïa, Grancher et Ledoux-Lebard) ont pu obtenir des tubercules miliaires de la grosseur d'un pois et contenant de la matière puriforme en inoculant les bacilles morts dans *le péritoine*, le cobaye auquel j'avais inoculé 4 c.c. d'émulsion préparée avec des bacilles tuberculeux très virulents tués est resté indemne; la chose est d'autant plus frappante que cette même émulsion, en injection intraveineuse chez le lapin, a bien donné lieu à un tubercule caséifié.

Le bacille tuberculeux humain avirulent et le bacille tuberculeux des poissons n'ont donné lieu, comme nous le savons, à aucune modification chez les animaux qui en ont été inoculés. Il se dégage donc de toutes ces observations ce fait général que *l'effet des bacilles tuberculeux morts est différent suivant le degré de virulence que possèdent ces derniers, et que la différence dans les résultats obtenus par divers auteurs tient à la différence de virulence des bacilles expérimentés.*

En se basant sur des expériences exécutées dans son Institut, Baumgarten[1] niait que les bacilles tuberculeux tués puissent donner lieu à la dégénérescence caséeuse : il pensait que dans les cas où l'on observait la caséification, les bacilles n'étaient pas réellement morts, et appelait les tubercules provoqués par les bacilles tuberculeux morts : *Fremdköaper — Proliférations Knötchen.*)

Quelques faits cependant contredisent ces affirmations. Après une stérilisation à 120° durant 1/2 heure, les bacilles ont laissé stérile un milieu glycériné qui en fut ensemencé, et ils ont laissé intacts tous les cobayes que j'ai inoculés avec des viscères provenant des animaux qui avaient été inoculés préalablement avec les bacilles tuberculeux morts; on est donc obligé d'admettre, sans aucune restriction, que *ces bacilles étaient bien morts. Étant donné maintenant que ces derniers ont pu néanmoins provoquer des tubercules à cellules géantes, typiques, ceux-ci doivent bien être considérés comme des follicules tuberculeux, et tout le processus comme de nature tuberculeuse.*

Il n'y a qu'une différence quantitative entre les tubercules du

1. *Baumgarten Iahresbericht* 1892, p. 689. 1899, p. 387.

bacille vivant et du bacille mort. Quand les bacilles tuberculeux vivants envahissent les tissus, ils s'y *multiplient*, et mettent ains progressivement un nombre d'agents continuellement augmentant à l'œuvre de formation et de destruction ; le processus tuberculeux s'étend rapidement aux parties voisines, et l'infection, en un mot, amène finalement la cachexie, le marasme, la mort. Il en est autrement pour le bacille tuberculeux mort : il ne se multiplie pas, l'effet irritant et la quantité de toxines restent constants, le processus tuberculeux se localise aux organes sur lesquels l'inoculation a porté.

La différence entre l'effet des bacilles tuberculeux *avirulents vivants* d'un côté et celui des mêmes bacilles à l'état *de mort* mérite l'attention ; tandis que l'inoculation des bacilles tuberculeux vivants s'accompagnait toujours de la formation de cellules géantes, l'inoculation des bacilles tués ne s'accompagnait pas du même phénomène.

Cela nous montre que les substances que contient le B. tuberculeux mort ne suffisent pas par elles-mêmes pour donner naissance à la cellule géante. De même que les fils de soie ne forment les cellules géantes que lorsqu'ils sont carbolisés, la cellule géante tuberculeuse a besoin, elle aussi, pour sa formation, de certaines substances chimiques qui existent bien chez les bacilles tuberculeux avirulents vivants de l'homme et des poissons, mais disparaissent à 120°. On remarque que les bacilles tuberculeux humains *très virulents* ont conservé leur faculté de provoquer la caséification et la formation des cellules géantes même après avoir été soumis à l'action de la chaleur à 120° ; l'observation que la chaleur d'un certain degré détruit les substances nécessaires à la fabrication de cellules géantes n'est donc pas applicable à tous les cas. Les substances, qui permettent aux bacilles très virulents de produire la caséification et de provoquer la formation de cellules géantes, ne doivent donc pas être, en raison de leur résistance même à cette chaleur de 120°, des substances albuminoïdes ou des ferments ; ces substances paraissent être intimement unies au corps du bacille, puisque la *tuberculine*, tirée des substances solubles des bacilles, est incapable d'amener la caséification ou la formation des cellules géantes.

On peut donc, après tout ce que nous venons de dire, ad-

mettre avec certitude qu'à l'inverse *de la tuberculose infectieuse provoquée par les bacilles tuberculeux vivants, le B. tuberculeux mort produit une tuberculose toxique. La tuberculose infectieuse amène la généralisation ; la tuberculose toxique reste localisée aux organes qui ont été infectés directement; elle est, par conséquent, une tuberculose toxique locale.*

Ces faits infirment ainsi l'opinion de *Baumgarten*, d'après laquelle la tuberculose ne pourrait être provoquée que par des bacilles vivants et capables de prolifération. *Au contraire : de même que Buchner a pu observer la fermentation du sucre sans l'intervention de la cellule de la levure vivante, il est aussi possible de provoquer la tuberculose sans l'aide de bacilles tuberculeux vivants.*

Cependant, outre que la substance active isolée de la levure, la « zymase », perd ses propriétés de ferment à la température de 120°, *les* 2 *processus diffèrent encore en ce que la tuberculose toxique n'a pu jusqu'ici être provoquée que par des toxines restées intimement liées aux parties organisées du bacille tué, tandis que la zymase donne la fermentation même si elle est séparée du corps de la levure. L'analogie se borne donc seulement à ce que fermentation et tuberculose peuvent se manifester sans l'intervention de l'énergie vitale des microorganismes. Ici encore nous trouvons de la ressemblance entre les bactéries et les levures.*

III. *Comment se comportent les animaux inoculés avec des bacilles tuberculeux de virulence différente, qu'il s'agisse de bacilles vivants ou de bacilles morts, vis-à-vis d'une tuberculine active.*

Après avoir inoculé les animaux avec des bacilles tuberculeux humains *très virulents et avirulents*, ainsi qu'avec des bacilles tuberculeux des poissons, je leur ai injecté 2 à 5 c.c. d'une solution à 5 0/0 de tuberculine brute dont chaque centimètre cube contenait 0,05 milligrammes de tuberculine. A cette dose de 0,1 à 0,25 milligrammes, la tuberculine provoquait toujours une réaction vive chez les animaux.

La température était prise toutes les heures à partir de la première après l'injection ; le maximum s'observait généralement au bout de 3 à 5 heures. Comme la température, surtout chez le cobaye, présente des variations normales, j'indique dans les tableaux suivants non pas la température même de

l'animal, mais seulement les *variations de température* occasionnées par la tuberculine.

1. *Les animaux inoculés avec* 0,1 *à* 0,25 *milligr. de bacilles vivants très virulents réagissaient déjà au bout de* 2 *à* 4 *semaines par une élevation de température de* 1° *à* 1°5.

2. *Les animaux inoculés avec* 0,1 *à* 0,25 *milligr. de bacilles tuberculeux vivants, avirulents, ne réagissaient le plus souvent que par une élévation de quelques dixièmes de degré, comme l'indique le tableau suivant :*

ANIMAL	TUBERCULEUX depuis :	QUANTITÉ de la tuberculine injectée.	HEURES après l'injection.	ÉLÉVATION de la température.
Lapin	10 jours	1,0 mgm.	4	0,1°
—	75 —	0,1 —	5	0,3°
Cobaye	7 —	0,1 —	3	0,7°
—	7 —	0,1 —	3	0,1°
—	22 —	0,1 —	3	0,2°

3. *Les animaux inoculés avec les bacilles tuberculeux des poissons vivants ne réagissaient à la tuberculine, employée même à dose de* 0,25 *milligr., que par une élévation de quelques dixièmes de degré, comme l'indique le tableau suivant :*

ANIMAL	TUBERCULEUX depuis :	QUANTITÉ de tuberculine.	HEURES après l'injection de la tuberculine.	ÉLÉVATION de la température.
Lapin	18 jours	0,1 mgm.	6	0,4°
—	18 —	0,25 —	6	0,8°
Cobaye	7 —	0,1 —	5	0,8°
—	30 —	0,1 —	3	0,4°

Les animaux inoculés avec des bacilles tuberculeux humains morts, virulents et avirulents, ainsi qu'avec des bacilles tuberculeux morts des poissons, réagissaient à des doses de 0,1 *à* 1 *milligr. de tuberculine, de*

la même manière que les animaux inoculés avec des bacilles tuberculeux vivants. Les 3 tableaux suivants en sont témoins.

4. Les animaux inoculés avec des *bacilles tuberculeux morts, très virulents* réagissaient de la façon suivante :

ANIMAL	TUBERCULEUX depuis :	QUANTITÉ de tuberculine.	HEURES après l'injection de la tuberculine.	ÉLÉVATION de la température.
Lapin	24 jours	0,1 mgr.	5	2,7°
Cobaye......	24 —	0,1 —	4	1,2°

5. Les animaux inoculés avec des *bacilles tuberculeux morts, avirulents*, réagissaient de la façon suivante :

ANIMAL	TUBERCULEUX depuis :	QUANTITÉ de tuberculine.	HEURES après l'injection de la tuberculine.	ÉLÉVATION de la température.
Lapin.......	5 jours	0,1 mgm.	5	
—	70 —	1,0 —	4	0,4°
—	75 —	1,0 —	5	0,2°
Cobaye	26 —	0,1 —	3	0,6°
—	90 —	0,1 —	5	0,3°

6. Les animaux inoculés avec des bacilles tuberculeux morts des poissons réagissaient de la façon suivante :

ANIMAL	TUBERCULEUX depuis :	QUANTITÉ de tuberculine.	HEURES après l'injection de la tuberculine.	ÉLÉVATION de la température.
Lapin........	18 jours	0,1 mgm.	4	0,4°
Cobaye	26 —	0,1 —	3	0,5°

Ainsi, comme le montrent ces tableaux, les animaux inoculés avec

des bacilles virulents, que ces derniers soient vivants ou morts, donnent, à la suite d'une injection de 0,1 à 1,0 milligr. de tuberculine, une hyperthermie dépassant toujours 1°, tandis que l'hyperthermie des animaux inoculés avec des bacilles morts, avirulents, ou avec les bacilles tuberculeux des poissons, ne dépassait généralement que quelques dixièmes de degré.

Je ferai remarquer particulièrement que ce que je voulais savoir, c'était *la manière dont se comportent les animaux inoculés des différentes façons que nous venons d'indiquer, vis-à-vis de doses de 0,1 à 1,0 milligr. de tuberculine, couramment employées dans un but de diagnostic.* Je n'ai aucun doute que les animaux inoculés avec des bacilles tuberculeux humains avirulents ou avec des bacilles tuberculeux des poissons ne puissent donner, avec l'augmentation de la dose de tuberculine, une hyperthermie dépassant 1°, comme cela s'observe même chez des animaux sains quand on leur administre une forte dose de tuberculine. Mais la question importante pour nous n'était pas celle de la dose à laquelle nos animaux réagiront à la tuberculine, mais bien celle de savoir si avec des doses ordinaires de tuberculine on pourra reconnaître la tuberculose chez les animaux inoculés avec les trois bacilles indiqués. Comme pour constater la tuberculose avec la tuberculine à dose courante, telle que nous l'avons employée dans nos expériences, on exige généralement une réaction dépassant 1°, — pour le cobaye, Kaspareck exige même une élévation dépassant au moins 1,2°, — nous devons dire *que les animaux inoculés avec des bacilles virulents, soit vivants, soit morts, doivent bien être reconnus cliniquement comme tuberculeux, et que les animaux inoculés avec les bacilles avirulents et avec des bacilles tuberculeux des poissons, doivent être reconnus cliniquement comme indemnes de toute tuberculose.*

IV. — *Manière de réagir des cobayes tuberculeux contre la tuberculine préparée avec des bacilles tuberculeux de virulence différente.*

C'est de la méthode de Nocard que je me suis servi pour la préparation des différentes tuberculines : des cultures en bouillon glycériné à 4 0/0, vieilles de 6 semaines, furent stérilisées à 110° et filtrées ensuite. Comme certains auteurs (Strauss,

Gamaleïa, Babes, Broca [1], Borrel) ont montré que des animaux tuberculeux réagissent contre les bacilles tuberculeux tués de la même façon que contre la tuberculine, j'ai dirigé mes expériences aussi de ce côté-là. J'ai procédé habituellement en préparant d'abord une émulsion avec 10 milligr. de bacilles cultivés sur pomme de terre et 10 cent. cubes d'eau stérilisée : chaque centimètre cube contenant ainsi 1 milligr. de bacilles, j'ai tué ensuite les bacilles en chauffant l'émulsion à 120°. Les injections se faisaient avec 0,2 à 3 cent. cubes d'émulsion, c'est-à-dire avec 0,2 à 3 milligr. de bacilles tuberculeux. Les cobayes soumis à l'expérience étaient ordinairement manifestement tuberculeux depuis 2-4 semaines ; leur tuberculose se manifestait parce que, dès la 2e semaine, ils présentaient au point de l'injection sous-cutanée des ulcérations tuberculeuses ; un peu plus tard, les ganglions inguinaux se tuméfiaient et l'autopsie faite ultérieurement confirmait la tuberculose. Sur chaque cobaye tuberculeux, je n'ai essayé la réaction qu'une seule fois.

1. *Les cobayes tuberculeux, qui ont reçu* 0,1 *à* 3 *milligr. de tuberculine tirée des bacilles tuberculeux très virulents, ou une quantité égale des mêmes bacilles tués, donnaient une élévation de température dépassant constamment* 1°.

2. *La tuberculine tirée des bacilles tuberculeux avirulents ou les corps morts de ces mêmes bacilles* ont provoqué les réactions suivantes :

TUBERCULEUX depuis :	QUANTITÉ de tuberculine ou de corps bacillaires morts.	HEURES après l'injection.	ÉLÉVATION de température matinale.
16 jours	2 mgm. de corps bacill.	3	0,5°
19 —	3 — —	6	0,2°
23 —	0,2 mgm. tuberculine	5	0,6°
36 —	2 — —	4	0,5°

3. La tuberculine préparée avec des bacilles tuberculeux des poissons, ou les corps mêmes de ces bacilles tués, a donné les réactions suivantes :

1. Untersuchungen über die Wirküng der Tuberkelbacillen ünd über gegenwirkende Substanzen. *Zeitschr. f. Hygiene*, 23.

TUBERCULEUX depuis :	QUANTITÉ de tuberculine ou de corps bacillaires.	HEURES après l'injection.	ÉLÉVATION de température matinale.
14 jours	2 mgm. de corps bacill.	4	0,2°
23 —	0,2 mgm. tuberculine	3	0,4°

Comme on le voit, la réaction que donnaient les cobayes tuberculeux contre l'injection de 0,2 à 3 milligr. de tuberculine, tirée soit des bacilles tuberculeux humains avirulents, soit des bacilles tuberculeux des poissons, ou contre l'injection de bacilles tués, ne se manifestait que par une élévation de la courbe thermique ne dépassant pas quelques dixièmes de degré; cliniquement donc, il n'y avait pas de réaction à la tuberculine.

En prenant en considération ce fait que les corps des bacilles tuberculeux se montraient constamment plus efficaces que la tuberculine tirée de ces bacilles, mais que même en fortes doses ils ne provoquaient pas la réaction de tuberculine, on peut dire *que la tuberculine tirée des bacilles tuberculeux humains avirulents ou des bacilles tuberculeux des poissons, ne donne pas, à la dose ordinaire, la réaction de la tuberculine.*

Mes recherches sur la tuberculine tirée des bacilles tuberculeux des poissons se trouvent ainsi en accord avec celles de Borrel. Nous ne doutons pas que de fortes doses ne puissent donner une réaction bien prononcée, comme cela a été observé par Ramond et Ravaut, qui, au moyen de 4 cent. cubes de tuberculine des poissons, avaient provoqué, dans un cas, chez un lapin tuberculeux, une ascension thermométrique de 1,2°. — Mais, par nos expériences, nous voulions uniquement savoir si les tuberculines préparées avec des bacilles de virulence différente, et employées à des doses habituelles, peuvent vraiment rendre service dans le diagnostic de la tuberculose, et le fait qui s'en dégage est que *les bacilles avirulents et des bacilles tuberculeux des poissons donnent une tuberculine inactive.*

DU ROLE DES BACTÉRIES DE L'INTESTIN

Par le Dr BIENSTOCK de Mulhouse.

Dans ma publication de l'année dernière sur le bacille anaérobie, nommé par moi *Bacillus putrificus*[1], et que j'ai démontré être un agent des plus actifs de la putréfaction, j'ai appelé, en terminant, l'attention sur le fait que les bacilles de l'intestin, *B. coli* et *B. lactis aerogenes*, gènent ou arrêtent la putréfaction de la fibrine.

Ce phénomène de l'arrêt de la putréfaction par ces deux microbes apparaît plus distinctement encore dans le lait.

On sait depuis longtemps que le lait cru empêche la putréfaction et on en a attribué la cause au lactose[2].

Dans mes expériences, j'ai vu que le lait stérilisé, ensemencé avec le *B. putrificus*, loin de gêner la putréfaction de la fibrine, la favorise. Au contraire, en infection mixte avec le colibacille, le lait stérilisé se comporte comme le lait non bouilli. La fibrine ne s'y putréfie pas, ce qui me faisait conclure que l'agent antiputride du lait cru n'est pas le lactose, mais une force antagoniste à ces deux bacilles qu'on rencontre toujours dans l'intestin.

J'ai fait pour le prouver des essais qui seront publiés *in extenso* autre part[3]. Je veux me borner à émettre ici quelques conclusions que je crois pouvoir en tirer.

Le fait que le lait stérilisé (et de même pasteurisé) a totalement perdu la force de résistance que possède le lait cru contre la putréfaction a, sans aucun doute, une grande importance pratique pour la nutrition des enfants malades des intestins.

D'après Escherich[4] et d'autres savants, il ne s'agit pas, dans les décompositions intestinales, d'un processus sans règles; selon la composition chimique du contenu des intestins, apparaissent

1. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1899, n° 11.
2. Winternitz, *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, XVI, p. 461. Seelig, *Virchow's Archiv.*, 1896, 146, p. 65.
3. *Archiv f. Hygiene.*
4. Escherich, Antiseptische Behandlungsmethode der Darmerkrankungen des Säuglings. *Therap. Monatshefte*, 1887.

telles ou telles espèces et telles ou telles fermentations, qui montrent pour chaque sorte d'alimentation un certain cours typique.

Dans les entérites folliculaires des enfants, il survient dans le gros intestin une putréfaction intense avec réaction alcaline des fèces. D'après Escherich, une nourriture hydrocarbonée est le meilleur moyen de rendre aux selles des enfants malades leur réaction faiblement acide et leur odeur normale.

D'un autre côté, les maladies des nourrissons qui se passent de préférence dans l'intestin grêle, et qui sont accompagnées d'une quantité anormale d'acides, furent influencées le plus favorablement et le plus rapidement par un régime strict d'albuminoïdes.

On peut donc facilement comprendre pourquoi l'alimentation par le lait stérilisé est nuisible dans tous les cas de maladies intestinales des nourrissons : dans les affections accompagnées de fermentations anormales, c'est son lactose qui agit ; dans les entérites folliculaires, qui sont liées à des processus de putréfaction, c'est sa puissance éminemment putréfiante. On pourrait donc dire : le lait stérilisé (ou pasteurisé) ne peut être donné sans dommage aux enfants malades des intestins. Ce n'est que dans un intestin sain, avec sa végétation bactérienne normale, que le lait stérilisé retrouve la flore de microbes utiles, qui sont propres au lait cru.

Je sais fort bien que le lait stérilisé de commerce et de ménage n'est que très exceptionnellement stérilisé. Cela a été démontré par Flügge et tout récemment par Weber [1], qui en a isolé 23 espèces de bactéries.

Mais toutes ces bactéries du lait soi-disant stérilisé sont celles qui décomposent le lait, soit en le peptonisant, soit en le putréfiant, et en le rendant par conséquent inutilisable et dangereux.

L'idéal serait de pouvoir préparer le lait pour l'usage immédiat, de telle façon que les microbes pathogènes qui s'y seraient introduits fussent tués, tandis que les bactéries, antagonistes de la putréfaction, resteraient en vie.

Comme cela n'est pas possible, on pourrait songer à com-

1. WEBER. Die Bacterien der sogenannten sterilisirter Milch, etc. *Arbeiten aus dem Kaiserlich. Gesundheitsamt.* B. XVII, Heft 1, 1900.

muniquer au lait stérilisé les qualités antiputrides du lait cru. Il semble facile de le faire en ajoutant au lait stérilisé, avant de l'employer, le colibacille ou un bacille lactique en culture pure. Mais il y aurait à cela trop de difficultés.

Il existe un autre moyen bien simple. D'après Du Mesnil, Vincent, Davalos, Péré, Dunbar et Weissenfeld, on rencontre le colibacille dans l'eau et on y trouve de même le *B. lactis aerogenes*.

Quand j'ajoutais au lait stérilisé, immédiatement après infection par le *B. putrificus*, de l'eau de la conduite d'eau de Mulhouse, une bonne eau potable, la putréfaction ne se produisait pas, et il ne survenait que les changements ordinaires au lait cru.

Si l'on a donc de la bonne eau potable à sa disposition, on pourra certainement, sans danger pour l'enfant, ajouter de petites quantités de cette eau au lait stérilisé, et procurer par là à l'enfant tous les avantages du lait stérilisé sans ses inconvénients.

Les résultats de mes expériences peuvent en outre contribuer à éclaircir les processus de putréfaction, jusqu'ici inexpliqués, qui se passent dans l'intestin normal.

A la fin de mon précédent travail, j'ai déjà indiqué que la décomposition du contenu de l'intestin, dans des conditions physiologiques, ne va jamais aussi loin que celle de l'albumine putréfiée hors du corps animal, et que la cause de ce phénomène, qui est sûrement dans l'intérêt de l'organisme, n'est pas encore connue[1].

J'avais vu que quand le *B. putrificus* se rencontre dans les tubes à essai avec les microbes ordinaires de l'intestin, une force antagoniste se manifeste qui souvent gène la putréfaction; j'ai vu de plus, dans mes études récentes, que si ces bactéries ont à leur disposition des substances hydrocarbonées saccharifiées, comme c'est toujours le cas dans l'intestin, la putréfaction est complètement supprimée.

J'ai donc cru devoir chercher, dans les circonstances encore inconnues qui provoquent la végétation florissante du *bacillus coli* et du *bacillus lactis aérogènes* dans l'intestin, de même que dans la présence abondante de ces deux espèces, une organi-

1. Olof Hammarsten, *Physiol. Chemie*, 1899, p. 304.

sation protectrice contre le développement illimité des anaérobies de la putréfaction et de leurs produits nuisibles.

J'ai continué mes recherches sur ce point.

J'ai examiné un grand nombre de fèces humaines et de fèces animales, quant à leur pouvoir de putréfier la fibrine; je n'ai jamais réussi à en obtenir une destruction de la fibrine avec formation de gaz fétides comme je l'ai toujours vu après ensemencement avec les anaérobies de la putréfaction.

C'est un fait très curieux, si l'on pense que les germes de ces bactéries pénètrent journellement dans les voies respiratoires et digestives de chacun, sous forme de poussière, qui n'est autre chose que de la boue séchée.

Les spores en forme de baguettes de tambour du *B. putrificus* devraient donc se trouver régulièrement dans l'examen microscopique des selles, d'autant plus que cet anaérobie trouve dans les intestins l'atmosphère la plus favorable à son développement. Mais jamais je ne l'ai rencontré dans les fèces normales.

Ne pouvant réussir à obtenir la putréfaction de la fibrine par l'ensemencement même copieux des fèces, ni du contenu du rectum de porcs et de canards qui avalent pourtant des masses de boue, je pensai d'abord que c'était la force antagoniste des bactéries du colon qui empêchait le développement des germes anaérobies introduits. Mais la putréfaction ne se produisit pas, même après élimination des colibacilles par chauffage à 80°.

Je ne réussis pas davantage à obtenir des cultures du *B. putrificus* au moyen des fèces, et il en a été de même pour tous les autres chercheurs qui travaillent la bactériologie des fèces depuis plus de vingt ans.

J'ai décrit pour la première fois le *B. putrificus* en 1884 à l'occasion d'un travail sur les bactéries des fèces. Je le croyais à cette époque un habitant constant des selles normales. Cela ne peut plus être maintenu, et je crois que c'est la stérilisation insuffisante de la fibrine employée pour mes essais de cette époque, qui m'a amené à la découverte de ce bacille.

Les anaérobies de la putréfaction, qui s'introduisent donc constamment dans le tube digestif, ont totalement disparu à la sortie des selles.

J'ai fait à ce sujet des expériences sur des lapins, et comme

je ne suis pas installé pour l'expérimentation sur des animaux, je me suis adressé à M. le professeur Lévy, de l Institut bactériologique de Strasbourg, qui a été assez aimable pour les faire.

Il se convainquit d'abord que les fèces normales des lapins n'ont aucune influence putréfiante sur la fibrine. Les lapins furent nourris avec de grandes quantités de spores du *B. putrificus*, et leurs fèces furent ensemencées sur de la fibrine. Il ne se produisit jamais de putréfaction.

J'ai fait un essai analogue sur moi-même.

Avec un peu de terre de jardin bien mélangée, ensemencée sur de la fibrine, j'obtins une décomposition putride de la fibrine et, au microscope, je vis une masse de bâtonnets aussi bien en forme de baguette de tambour qu'à têtes d'épingle.

Je pris journellement pendant trois semaines une dose de cette terre. Je ne vis jamais dans mes fèces de bâtonnets à tête, je ne réussis jamais à en cultiver une espèce anaérobie, jamais je n'obtins la putréfaction de la fibrine inoculée avec mes selles, ni *avec* leur contenu de colibacilles, ni après leur élimination par chauffage.

Pour savoir si la terre avalée par moi contenait des bacilles pathogènes, j'en envoyai une partie à M. le professeur Lévy qui, en infectant des animaux, obtint le tétanos. Mes selles de la troisième semaine de la période d'essai ne donnèrent pas le tétanos aux animaux injectés.

Cela correspond aux observations du P[r] Buchner. Il nourrit des souris avec des spores virulentes de charbon et vit que leurs fèces n'étaient plus infectieuses en inoculations sous-cutanées.

L'expérience que j'ai faite sur moi-même, chaque homme qui mange de la salade et des fraises la fait, pour ainsi dire.

A chaque forte pluie, ces fruits sont éclaboussés par de la terre et il ne sont sûrement pas délivrés de tous les germes qui s'y sont attachés avant qu'on les consomme. La terre de jardin contient, comme il est connu, le plus souvent des spores de tétanos. D'après cela, le bacille du tétanos devrait être un habitant constant de fèces humaines, et ce n'est pas le cas.

Au commencement de cette année il a paru un travail de Schütz[1] qui a fait de belles recherches dans cette direction

1. Schütz, Bacteriologisch-experimenteller Beitrag, zur Frage gastrointestinaler Desinfection. *Berliner klinische Wochenschrift*, 1900, n° 25.

avec le *Vibrio Metschnikoff*. Il l'introduisit directement en grandes quantités dans le duodénum des chiens, et ne l'a pas retrouvé dans leurs fèces. A l'autopsie, le vibrion fut trouvé encore abondamment dans l'intestin grêle ; dans le colon supérieur, peu ; on ne trouva plus que le colibacille dans le colon inférieur et dans le rectum.

Ainsi ce microbe, porté dans l'intestin plein de force vitale, y est complètement anéanti.

Schütz démontra en même temps, en nourrissant un chien avec le *Vibrio Metschnikoff*, que le suc gastrique le laisse intact. Il fut trouvé vivant dans le duodénum.

Si, dans la première expérience citée, on donnait en même temps de l'huile de ricin ou du calomel, on retrouvait le vibrion dans les déjections liquides qui suivaient les deux purgations, et avec le calomel en beaucoup plus grande quantité qu'après l'huile de ricin.

Schütz, sans s'expliquer positivement sur ces faits intéressants, ne veut pas croire à une influence des bactéries normales des intestins, mais incline à penser que cette disparition du *Vibrio Metschnikoff* doit être attribuée à des substances bactéricides, provenant des éléments des tissus.

Pourtant ces essais démontrent que ce sont ces bactéries qui y jouent le rôle principal.

Dans l'intestin grêle, qui ne renferme qu'un nombre relativement minime de colibacilles, le *vibrio* se trouve encore en grandes quantité; dans le colon, où la masse des bactéries normales de l'intestin augmente toujours, il diminue et disparaît enfin complètement.

Avec l'huile de ricin, de grandes quantités de bactéries des intestins sont chassées et n'ont pas le temps de déployer leur qualité antagoniste ; le *vibrio* réapparaît dans les selles, et encore plus abondamment après le calomel, au sujet duquel on peut admettre qu'il n'a pas seulement un effet purgatif, mais encore une influence affaiblissante sur les bactéries du colon.

Et si c'étaient des substances bactéricides qui font disparaître les microbes nuisibles, on ne comprendrait pas qu'elles n'anéantissent pas tout d'abord les bactéries normales des intestins, bien moins résistantes que les spores du *B. tetani*, du *B. putrificus* et de l'œdème malin.

Que ces derniers anaérobies se trouvent vivants dans certaines parties du tube digestif, c'est ce qui ressort du fait connu que, quand on tue des cobayes par asphyxie, des bacilles de l'œdème malin émigrent de l'intestin dans les organes voisins.

De plus, E. Klein[1] a prouvé que le bacille nommé par lui *B. cadaveris sporogenes*, qui n'est autre que mon *B. putrificus*, et qu'il regarde comme le facteur principal de la putréfaction cadavérique, ne se répand pas seulement après la mort, en sortant de l'intestin dans les organes, mais déjà pendant la vie, dans les affections graves intestinales, — c'est-à-dire quand la flore de bactéries normales de l'intestin est remplacée par des microbes pathogènes.

La question de l'antagonisme des bactéries normales de l'intestin vis-à-vis des microbes ennemis, auxquels appartiennent en première ligne ceux de la putréfaction, comme étant les plus répandus, méritent certainement des études approfondies.

E. Klein, Ein Beitrag zur Bacteriologie der Leichenverwesung, *Centralblatt fur Bacteriologie*, 1899. N° 8/9.

SUR UN NOUVEAU PROCÉDÉ DE CULTURE
DU BACILLE DU TÉTANOS

Par le Dr L. DEBRAND
(Travail du laboratoire de M. Roux.)

I

Je me propose d'étudier la culture du bacille tétanique, en symbiose avec le *bacillus subtilis*, dans un récipient quelconque usité pour les cultures aérobies, sans emploi du vide par conséquent, et cela sans que la toxine soit aucunement modifiée.

Je passe à dessein sous silence les procédés de Liborius et de Veillon, car ils ne permettent au bacille de Nicolaïer de pousser en tube aérobie qu'en gélatine ou en gélose, grâce à l'addition d'une substance facilement oxydable, telle que la glucose. Or les milieux solides ne conviennent pas pour la préparation de la toxine tétanique.

Dès 1884, M. Roux avait signalé ce fait « qu'on peut mettre à profit la propriété d'absorber l'oxygène de l'air qu'ont certains microbes, le *bacillus subtilis*, par exemple ». Quelques années plus tard (1887), il avait appliqué cette méthode à la culture du bacille du tétanos.

J'ai pensé que, dans cette expérience de M. Roux, il y avait autre chose qu'un tour de main élégant pour cultiver les anaérobies en tube ouvert, j'ai pensé qu'il y avait un procédé dont la pratique pourrait tirer parti.

M. Roux séparait, dans son expérience, par un bouchon de gélose, le *bacillus subtilis* du bacille tétanique, parce qu'il voulait avoir ce dernier à l'état de pureté. Quand, au contraire, on se propose d'obtenir la toxine tétanique, on peut cultiver les deux bacilles dans le même bouillon, à condition que la culture mixte soit aussi toxique que la culture pure du bacille tétanique. Pour savoir s'il en est ainsi, il faut consulter l'expérience.

Le *bacillus subtilis* dont je me suis servi a été isolé du foin. Après une heure de macération dans l'eau chaude et une malaxa-

tion de quelques instants, dans le but d'entraîner toutes les spores, des pipettes furent remplies à moitié avec le produit du lavage : puis scellées à la lampe et soumises à l'ébullition pendant un temps variable. La plupart de ces pipettes mises à l'étuve m'ont donné un voile, ou plutôt un fragment de voile, avec lequel fut pratiqué l'ensemencement définitif en bouillon. J'avais choisi un *subtilis* résistant à 1 h. 20 d'ébullition. Ce procédé, que je dois en partie à l'obligeance de M. Fernbach *junior*, est plus rapide que le procédé classique.

Avant d'aller plus loin, il importe de savoir si le *subtilis* que nous venons d'isoler peut être injecté impunément à un animal.

Beumer et Peiper ont vu, en opérant sur le cobaye, que les injections intrapéritonéales de cultures entières de *bacillus subtilis*, si elles sont faites à doses massives ou si elles sont faites à intervalles trop rapprochés, cachectisent l'animal et finissent par le tuer. Mais si les doses sont minimes (2 c. c. environ) et si les injections sont espacées, l'animal ne subit aucun dommage. Si le *bacillus subtilis* a passé par l'organisme, les choses peuvent changer. MM. Charrin et de Nittis disent l'avoir rendu pathogène (*Société de Biologie*, 1897). Ceci m'obligeait à rechercher si le *B. subtilis* que j'ai employé n'élabore pas quelque produit nuisible pour l'organisme.

Il n'en est rien. Souvent j'ai injecté en une seule fois, à des cobayes, 30 c. c., 40 c. c. de culture filtrée, en prenant seulement la précaution d'opérer lentement et de faire tiédir préalablement le filtrat ; j'ai renouvelé ces injections à plusieurs reprises chez le même animal, celui-ci n'a jamais été incommodé. Bien au contraire, semble-t-il : on aurait pu assimiler l'effet produit par ces inoculations à celui que produit une injection de sérum artificiel. Il y a mieux. Depuis 18 mois, j'injecte à des cobayes régulièrement tous les 15 jours (dans le péritoine) des doses de 10 c. c. de filtrat de *B. subtilis* provenant de cultures plus ou moins anciennes sans provoquer aucun trouble dans l'état général de ces animaux. Au début de l'expérience, ils pesaient 200 grammes. Aujourd'hui ils pèsent plus de 750.

L'inoculation intraveineuse a été tout aussi inoffensive. Pendant 6 mois un lapin a reçu dans la veine marginale de l'oreille, tous les 15 jours, 5 c. c. Pas de réaction.

Il en a été de même pour les injections sous-cutanées. Même chez l'homme ces injections sont anodines.

De ce que le *B. subtilis* ne sécrète aucune toxine, lorsqu'il vit seul dans son milieu de culture, il n'en résulte pas, il est vrai, qu'il est incapable d'en produire en culture mixte avec le bacille du tétanos. Mais nous allons voir que le liquide où ont végété tétanos et subtilis se comporte, après filtration, comme le liquide où a vécu le tétanos seul. Il n'y a donc pas à tenir compte ici des produits laissés dans la culture par le *bacillus subtilis*.

ÉTUDE DE LA CULTURE MIXTE

Le bacille tétanique dont je me suis servi a été isolé de la terre du jardin de l'Institut par le procédé de M. Vaillard (3 chauffages successifs à 100° pendant 2 minutes, et culture consécutive dans le vide) : il a été ensemencé, concurremment avec le *B. subtilis*, dans du bouillon constitué de la façon suivante :

Extrait de Liebig................................	5	grammes
Peptone Chapoteaut............................	10	—
Chlorure de sodium............................	5	—
Eau..	1000	—

Quelques essais faits avec le bouillon peptonisé ordinaire m'ont convaincu que celui-ci donnait aussi de très bons résultats.

Kitasato a constaté que si l'on veut réussir à coup sûr une culture de tétanos, il faut employer du bouillon frais. J'ai pourtant obtenu des cultures anaérobies de tétanos en ensemençant celui-ci dans des cultures filtrées de *B. subtilis*, datant de 6 et 8 semaines. Je dois avouer toutefois qu'il y avait certaines différences entre ces cultures et les cultures anaérobies ordinaires : l'odeur était plus âcre, les bacilles étaient incurvés et grêles, et l'on constatait une diminution de la toxicité. Ce n'est guère que lorsque la culture du *b. subtilis* n'a pas plus d'une quinzaine de jours qu'on obtient de belles cultures de tétanos anaérobie, comme si celui-ci avait été ensemencé dans du bouillon frais. La culture du *subtilis* dans le bouillon semble donc donner naissance à un principe favorisant. A un moment donné même, j'avais tenté d'habituer le bacille de Nicolaier à la vie aérobie en le faisant vivre dans ces filtrats, d'où je chassais l'air progressivement. Je n'ai pas obtenu l'aérobiose complète du téta-

nos, mais les résultats acquis ont été une confirmation de l'existence de ce principe favorisant[1].

Il n'en est pas de même quand on cultive simultanément le *bacillus subtilis* et le bacille tétanique. La culture est abondante même dans des bouillons anciens. Je devrais dire « surtout » dans des bouillons anciens, quelque paradoxal que cela paraisse. J'ai essayé des bouillons de différents âges, de 1 à 75 jours : c'est ce dernier qui m'a fourni la meilleure toxine. Ce bouillon était conservé à l'air libre dans des ballons non fermés à la lampe. La lecture comparative des tableaux A et B suffit pour emporter la conviction à cet égard. Ces tableaux résument quelques-unes des nombreuses expériences faites sur les cobayes. Il m'a paru inutile de les donner toutes, car les résultats ont toujours été à peu près concordants. Cet « à peu près » ne saurait surprendre des expérimentateurs. Chacun sait en effet que dans ces expériences sur les toxines, quand on approche de la dose minima mortelle, les résultats dépendent de la résistance variable des animaux. Pour obtenir des chiffres exactement concordants, ou peu s'en faut, je n'avais qu'à augmenter les doses; mais, ce faisant, je n'aurais pas analysé aussi étroitement l'action de la toxine.

Dans les tableaux ci-annexés on verra : 1° *que dans le bouillon frais la toxine se forme un peu plus vite, mais qu'elle disparaît aussi plus rapidement* ; 2° *qu'avec le vieux bouillon la toxine apparaît moins vite, mais persiste plus longtemps*; 3° *que dans les deux cas le maximum de toxicité est atteint vers le* 5e *ou* 6e *jour*.

Maintenant que nous avons isolé nos deux microbes et que nous connaissons bien le milieu où ils vont vivre, il faut les ensemencer.

Quel *âge* doit avoir la semence? Convient-il d'ensemencer avec une culture de *subtilis*, avec le voile, avec les spores? J'ai combiné tous les modes possibles d'ensemencement. Au début, il y a des nuances, mais au bout de 48 heures, toutes les cultures se ressemblent. Toutefois je pense qu'il est préférable de faire bouillir le *subtilis* dans le récipient même où il a vécu. Après 2 minutes, on retire le tube, on laisse refroidir et l'on

1. Les animaux inoculés avec ces filtrats de B. subtilis ne sont pas plus aptes à contracter le tétanos que les animaux sains. Ce principe favorisant disparaît donc *in vivo*.

agite, afin de rendre la semence bien homogène. On fait de même pour le bacille tétanique et l'on ensemence avec parties égales des deux microbes (1 c. c. par litre environ).

On pourrait se contenter d'ensemencer le bouillon contenant le bacille de Nicolaier avec une trace de *subtilis*, les cultures seraient seulement plus tardives. Pour avoir une culture rapide, il vaut mieux ensemencer largement et tétanos et *subtilis*.

La *forme* des vases de culture est indifférente : il faut seulement ne pas perdre de vue que, la réussite de la culture dépendant uniquement de la vitalité du *subtilis*, il est nécessaire d'éliminer tout récipient à goulot étroit où l'air n'accéderait pas avec la plus grande facilité.

Les deux microbes étant ensemencés, la culture va se faire. Naturellement, le *subtilis* se développera le premier ; le voile se formera, plus épais que dans la culture de *subtilis* seul, et, au bout de 24 heures, le bacille en épingle commencera à croître à son tour. Pendant que le microbe aérobie pousse, le liquide est uniformément trouble, plus tard il devient jaunâtre et épais, ne différant en rien d'une culture anaérobie ordinaire. Après une semaine environ, la culture s'éclaircit et il se forme au fond du flacon un dépôt plus abondant que dans les cultures anaérobies. Pour voir facilement la constitution de ce dépôt, faisons la culture mixte dans un tube à essai terminé par une effilure. Avec une pipette, puisons dans cette effilure et portons une trace du dépôt sous le microscope. On y verra des bacilles et surtout des spores tétaniques, et de plus un grand nombre de *B. subtilis* de tout âge et de toutes dimensions. On est frappé par le peu de mobilité de ceux-ci. Même au début d'une culture mixte, le *subtilis* est moins mobile que quand il est seul.

L'*odeur* des cultures fournit un caractère distinctif important. Elle est absolument la même que celle d'une culture anaérobie ordinaire, avec cette différence toutefois que, dans cette dernière, l'odeur est plus concentrée : il faut donc attendre quelques instants, après l'ouverture d'un tube anaérobie, pour percevoir la véritable odeur, laquelle est alors identique à celle d'une culture mixte. Lorsque l'odeur est altérée, on peut être certain qu'il y a une impureté. Dans un tube aérobie, l'odeur disparaît au bout de quelques jours. Le moment de cette disparition m'a paru coïncider avec le moment où la culture atteint

son maximum de toxicité. En faisant une prise dans le tube, on peut percevoir l'odeur pendant longtemps.

Lorsque la culture mixte a fait un séjour prolongé à l'étuve, elle se concentre, par suite de l'évaporation, au point de devenir sirupeuse et brunâtre : elle répand alors une odeur suave qui rappelle celle de la tuberculine. Cette odeur est due surtout au *B. subtilis*.

On peut mettre la culture mixte à 22° ou à 34° d'emblée, cela n'a pas grande importance ; pourtant, comme le *subtilis* est un bacille thermophile, ainsi que le tétanos qui vit très bien à 44° et même à 45°, il est préférable d'exposer les cultures à une température d'au moins 34° pendant les premiers jours, jusqu'à ce que la toxine ait atteint son maximum. Nous verrons plus loin que cela se produit vers le 5e ou 6e jour. A partir de ce moment, comme le prouvent les tableaux annexés à ce mémoire, il n'y a aucun avantage à laisser les cultures à une température élevée : au contraire, car la toxicité ne fait que diminuer.

Le tableau C montre que ce phénomène n'est pas spécial aux cultures mixtes. M. le Dr Momont m'a dit avoir remarqué, lui aussi, cette diminution de la toxicité dans les cultures laissées à l'étuve. Tous les auteurs d'ailleurs admettent que la lumière, la chaleur et l'air atténuent et finissent par faire disparaître le principe actif de la culture filtrée.

De plus, il y a une cause d'atténuation spéciale aux cultures mixtes. M. Metchnikoff a prouvé (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1897) que le *subtilis*, vivant dans de la toxine tétanique, affaiblit celle-ci considérablement et finit même par la détruire. Je puise dans cette constatation de M. Metchnikoff un nouvel argument pour dissuader de laisser les cultures mixtes à l'étuve au delà de 5 à 6 jours. Cette action du *subtilis* nous rend compte de la différence notable qu'il y a au point de vue de la toxicité entre les tableaux A et C. On voit dans le tableau A que la toxine produite par le *subtilis*, en symbiose avec le tétanos dans le bouillon frais, diminue de force bien plus rapidement que dans les cultures anaérobies du tableau C, à partir du jour où le maximum de toxicité a été atteint. Le tableau B montre que la culture mixte en bouillon ancien est vraiment supérieure pour la production de la toxine. Je me borne à enregistrer cette particula-

rité, sans chercher à expliquer un phénomène dont la chimie nous donnerait peut-être la clef.

Comme conclusion je dirai : si l'on se sert de bouillon frais pour les cultures mixtes, *il ne faudra pas laisser celles-ci à l'étuve plus de 5 ou 6 jours;* si l'on fait usage de vieux bouillon, la durée du séjour à l'étuve n'a plus la même importance, toutefois il vaudra mieux retirer les cultures de l'étuve à 34° le 5e jour, puisqu'elles ne gagnent plus en toxicité à partir de ce moment.

AUTRES MICROBES DOUÉS DES MÊMES PROPRIÉTÉS

Le *subtilis* n'est pas le seul microbe doué de la propriété de faire pousser le bacille de Nicolaier. Il ne s'agit donc pas ici d'une propriété spécifique. Assurément le *bacillus subtilis* est hors de pair, mais un certain nombre de microbes aérobies, mis en symbiose avec le bacille tétanique, permettent à celui-ci de pousser et d'élaborer une toxine plus ou moins active.

Le *B. mesentericus* doit être mis en tête de la série sur la même ligne que le *subtilis*. J'ai répété avec ce microbe les expériences faites avec le *subtilis*, et je n'ai pas constaté de divergence dans les résultats, soit *in vivo*, soit *in vitro*. En somme, cela n'est pas surprenant, car plus on examine *Mesentericus* et *Subtilis*, moins on est capable de les distinguer. Les caractères tirés de la mobilité, de l'odeur, des colonies sur gélatine, du voile ne sont pas du tout caractéristiques. Mais je n'insiste pas.

La *bactéridie charbonneuse* est un microbe très avide d'oxygène, moins cependant que les deux microbes précédents. Si on ensemence la bactéridie avec le bacille tétanique, celui-ci poussera, mais on observera les particularités suivantes : 1° il va de soi que le microbe aérobie se développe d'abord, et dans les 2 ou 3 premiers jours, on ne voit dans la culture que les ondes moirées de la bactéridie ; vers le 5e jour, la culture a un aspect plutôt louche que jaunâtre et épais : rapidement des grumeaux se forment et tombent au fond du tube. L'odeur du tétanos est peu accentuée. 2° au microscope tous les bâtonnets bactéridiens sont sporulés. De plus, c'est à peine si l'on voit quelques bacilles tétaniques mobiles : presque tous sont sporulés. Par conséquent la bactéridie ne convient pas pour une culture prolongée.

Cette culture est-elle toxique?

Ensemençons, dans un tube de bouillon d'un mois, une goutte de spores tétaniques et une goutte de spores charbonneuses bouillies. Filtrons le 6e jour et inoculons 3 cobayes d'environ 450 grammes. Le 1er, inoculé avec 1/20 de c. c., meurt tétanique en 2 jours. Le 2e, inoculé avec 1/50 de c. c., meurt en 4 jours. Le 3e, inoculé avec 1/100 de c. c., meurt en 8 jours. La bactéridie fait donc pousser le tétanos, mais elle donne une toxine plus faible. Du reste il ne saurait venir à l'esprit de préparer ainsi la toxine tétanique : cette expérience est donc sans aucune portée pratique.

Il était tout indiqué de rechercher si les microbes que M. Vaillard appelle « favorisants » donnent une culture avec le bacille tétanique, quand ils sont mis en symbiose avec lui. J'ai pris pour type le *prodigiosus*.

Ensemençons une goutte de spores tétaniques bouillies et une goutte de culture de *prodigiosus* de 24 heures. Dès le lendemain la culture a poussé abondamment. Si la culture est à 22°, elle se recouvre d'un voile rouge complet; si elle est à 34°, il n'y a à la surface du liquide qu'une petite collerette rouge. La culture n'est complète que vers le 5e jour : alors l'odeur du tétanos est nettement perçue, et l'aspect de la culture est semblable à celui de la culture mixte du tétanos et du *subtilis;* elle est seulement un peu moins épaisse et elle est teintée de rouge.

L'inoculation chez les animaux donne des résultats intéressants. Elle prouve que si le *Prodigiosus* est un microbe favorisant, lorsqu'il est injecté *in vivo*, avec le tétanos, il n'est pas du tout favorisant *in vitro*, au point de vue de la production de la toxine, puisque les animaux inoculés avec 1/200, 1/50, 1/20 de c. c. de culture filtrée n'ont jamais pris le tétanos : ils ne le prennent que quand on leur inocule une dose notable de culture virulente, mais nous savons déjà cela par M. Vaillard.

En regard de cette expérience, il faut noter que le *subtilis*, qui est *in vitro* un microbe favorisant de premier ordre, qu'il s'agisse de la culture virulente ou de la production de la toxine, n'est jamais favorisant *in vivo*, qu'il soit injecté à l'état de spores ou à l'état de bacilles concurremment avec le tétanos. Ainsi j'injecte, dans la patte postérieure d'un cobaye, une goutte de spores tétaniques bouillies 2 minutes et une goutte de culture de *subtilis* de 24 heures. Cette dose énorme est sans action sur

l'animal. Pendant 2 ou 3 jours il a une très légère parésie de la patte, puis tout rentre dans l'ordre. L'animal est tout aussi sensible au tétanos, puisqu'il succombe à l'inoculation d'une simple dose mortelle. Cette expérience, renouvelée chez deux autres cobayes, les laisse absolument indifférents à l'injection. Trois autres cobayes ont reçu, dans la patte, parties égales de spores tétaniques et de spores de *subtilis* bouillies : aucun phénomène anomal ne survient.

Les cultures mixtes de tétanos et de *subtilis* peuvent être faites en série. Je n'ai pas poussé au delà de la quinzième culture : cela m'a paru suffisant pour établir que les cultures ne sont pas modifiées par ces ensemencements successifs. La réaction des cultures mixtes est très alcaline.

J'ai essayé par le même moyen de renforcer la toxicité d'un bacille tétanique relativement peu actif, puisque le liquide filtré le plus toxique tuait en 48 heures un cobaye de 460 grammes à la dose de 1/200 de c. c. de culture en vieux bouillon. Le poids de l'animal doit entrer en ligne de compte. Ainsi telle dose tue un petit cobaye en 3 jours, qui, chez un cobaye de poids double, produira simplement un tétanos local, lequel guérira en quelques semaines ou ne tuera que très tardivement. J'ai pu exalter la toxicité de ce bacille tétanique. Par passage en sac d'une culture mixte en péritoine de cobaye, j'ai obtenu au 4e passage un bacille dont la toxicité était double. Dès les premières expériences, je me suis aperçu que cette culture mixte en sac tuait toujours l'animal le 5e jour par tétanos abdominal. Aussi, pour l'expérience définitive, ai-je pris soin de retirer le sac avant la mort de l'animal. Entre chaque passage je faisais une culture et j'ensemençais le sac suivant avec une goutte d'une culture de 24 heures.

Conclusions. — De ce travail découle cette conclusion que *la toxine élaborée par la culture en symbiose du bacille tétanique et du bacillus subtilis est identique à celle que produit le bacille de Nicolaier cultivé seul en anaérobie.*

En conséquence, il y aura avantage à substituer cette méthode, étant donnée sa facilité d'exécution, à la méthode habituellement employée, s'il est prouvé, par un travail ultérieur, que le sérum des animaux vaccinés avec cette toxine est iden-

tique au sérum fourni par les animaux immunisés avec la toxine ordinaire. *A priori*, cela est probable.

TABLEAU A

CULTURES FILTRÉES DE T. + S. BOUILLON FRAIS

DOSE INJECTÉE : 1/200 DE C. C.

POIDS	AGE DE LA CULTURE	RÉSULTATS
450	48 heures.	Tétanos Guéri en 1 mois.
500	48 —	— Meurt en 8 jours.
660	3 jours.	— Guéri en 1 mois.
360	3 —	— Meurt en 2 jours 1/2.
390	4 —	— — en 4 jours.
480	4 —	— — en 5 j. 1/2.
445	5 —	— — en 4 jours.
400	5 —	— — en 3 jours.
380	6 —	— — en 3 j. 1/2.
500	6 —	— — en 4 jours.
700	7 —	— — en 6 jours.
600	7 —	— — en 8 jours.
620	8 —	— — en 6 jours.
690	9 —	— — en 10 jours.
725	9 —	— — en 3 semaines.
540	10 —	— — en 1 mois.
620	11 —	— léger, guéri.
575	12 —	— très fort, guéri.
500	13 —	Rien.
410	14 —	Tétanos guéri en 1 mois.
530	15 —	Rien.
380	15 —	Légère raideur de la patte. Guéri en 5 jours.
380	16 —	Très léger tétanos, guérison.
520	17 —	Tétanos guéri en 2 mois.
340	20 —	Rien.
500	23 —	Tétanos guéri en 6 jours.
500	25 —	Rien.
370	29 —	Rien.
395	37 —	Rien.
390	2 mois.	Rien.

TABLEAU B

CULTURES FILTRÉES DE T. +S. BOUILLON DE 2 MOIS 1/2

(INJECTION DE 1/200 C. C.)

POIDS	AGE DE LA CULTURE	RÉSULTATS
500	48 heures.	Rien.
480	48 heures.	Rien.
637	3 jours.	Tétanos. Meurt en 3 jours.
380	3 —	— — 3 —
390	4 —	— — 2 jours 5 h.
310	4 —	— — 2 —
430	5 —	— — 2 jours 1/2.
460	5 —	— — 2 —
340	6 —	— — 3 —
460	6 —	— — 3 —
470	7 —	— — 3 —
490	7 —	— — 4 —
410	8 —	— — 4 —
350	9 —	— — 3 — 1/2.
450	10 —	— — 3 — 1/2.
480	11 —	— — 4 —
400	13 —	— — 3 —
390	14 —	— — 4 —
405	15 —	— — 4 — 1/2.
380	16 —	— — 5 —
470	18 —	— — 4 —
405	19 —	— — 4 —
500	20 —	— — 5 —
350	21 —	— — 5 —
400	29 —	— — 8 —
500	35 —	— — 10 —

TABLEAU C

CULTURES ANAÉROBIES ORDINAIRES FILTRÉES

(INJECTION DE 1/200 DE C. C.)

POIDS	AGE DE LA CULTURE	RÉSULTATS
500	2 jours	Tétanos. Meurt en 2 jours.
440	3 —	— — 2 — 3/4.
800	4 —	— — 3 — 1/2.
510	5 —	— — 2 — 1/2.
480	6 —	— — 3 —
510	6 —	— — 3 — 1/2.
650	7 —	— — 5 —
700	7 —	— — 4 — 1/2.
495	8 —	— — 5 —
470	8 —	— — 3 — 1/2.
550	9 —	— — 4 —
570	10 —	— N'est pas mort en 2 mois.
500	11 —	— Meurt en 7 jours.
500	12 —	— — 6 —
640	13 —	— très léger.
540	14 —	— Meurt en 6 jours.
525	15 —	— — 6 —
525	16 —	— — 7 —
490	17 —	— Guérison.
625	18 —	— Extrêmement léger.
470	20 —	Rien.
610	23 —	Tétanos. Guérison.
430	25 —	Rien.
470	29 —	Tétanos extrêmement léger.
840	2 mois.	Rien.
550	9 semaines.	Rien.

Toutes ces cultures anaérobies ont été faites dans le tube de M. Roux, d'une contenance de 10 c. c. et conservées à l'étuve à 34°.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

Le Gérant : G. Masson.

14me ANNÉE DÉCEMBRE 1900 No 12

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

INFLUENCE DE L'INTOXICATION BOTULINIQUE
SUR LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

Par le Dr V. P. OSSIPOFF

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Le botulisme, état morbide provoqué par l'ingestion de conserves de viande ou de poisson, dans lesquelles s'est formée une certaine toxine, est connu depuis longtemps. Quant à son agent pathogène, un microbe anaérobie, qui dans certaines conditions élabore une substance toxique, il fut découvert seulement vers 1895 par M. le professeur *E. van Ermengem.*

Cet observateur a pu isoler ce microbe dans des cultures faites avec des conserves de jambon pendant l'épidémie de botulisme qui a eu lieu à Ellezelles (village de Belgique, Hainaut). Van Ermengem baptisa ce microbe du nom de *bacillus botulinus,* l'étudia et le décrivit en détail.

Il donna une description exacte de la marche clinique de cette maladie, qu'il avait observée chez les membres d'une société philharmonique (trois membres moururent, deux furent gravement malades). Afin d'étudier la nature et les propriétés de cette toxine, Ermengem avait fait de nombreuses expériences sur des animaux (souris, rats, poules, pigeons, cobayes, chiens, chats et singes).

Ces expériences ont démontré avec évidence que les phénomènes morbides sont provoqués par une substance toxique élaborée par le bacille récemment découvert. Ermengem publia toute une série d'articles sur les résultats de ses recherches (1).

Dans ses expériences, il se servait du jambon qui avait produit l'épidémie, de l'extrait aqueux de ce jambon, de la macération, et enfin des cultures du bacille qu'il avait découvert. D'après ses études cliniques et expérimentales, Ermengem fait ressortir que la toxine botulinique produit son effet nocif sur l'organisme animal en se localisant principalement sur le système nerveux central : en effet, la plupart des symptômes propres au botulisme sont précisément d'origine centrale. Ce sont, par exemple, les phénomènes ophtalmoplégiques, paralysie de la paupière supérieure (ptosis), mydriase, trouble de l'accommodation visuelle, et ensuite dysphagie, aphonie, trouble de la miction, paralysie et parésie des muscles striés, troubles cardiaques, etc.

Les symptômes de l'intoxication chez les animaux présentent beaucoup d'analogie avec ceux qu'on observe chez l'homme. Les animaux sur lesquels les expériences réussissent le mieux sont : le pigeon, le cobaye, le chat et le singe, et c'est surtout le chat qui présente le tableau le plus complet de l'intoxication botulinique. Voici ce que Ermengem dit là-dessus : « Les phénomènes d'intoxication chez le chat sont tels, qu'on peut les considérer comme pathognomoniques du botulisme ; ce sont : dilatation prolongée de la pupille, troubles de sécrétion des glandes du larynx et des bronches, différentes parésies partielles dont les conséquences sont : prolapsus de la langue, aphonie, aphagie, rétention de l'urine, de la bile, toux croupale, etc. (2). »

Les phénomènes d'origine centrale ont une telle prédominance dans le botulisme, qu'Ermengem admet la possibilité de confondre ce dernier, en cas d'absence de renseignements sur les antécédents du malade, soit avec la paralysie asthénique bulbaire de Strümpel, soit avec les syndromes d'Erb, soit encore avec la polyencéphalomyélite subaiguë, ainsi qu'avec certaines formes d'ophtalmoplégie (3).

L'examen microscopique, fait par M. G. Marinesco, du système nerveux central des animaux sur lesquels Ermengem avait fait ses expériences, a donné l'explication des phénomènes cliniques du botulisme. Marinesco a trouvé de graves modifications dans la moelle et le bulbe ; les cornes antérieures étaient plus modifiées que les cornes postérieures ; presque pas de modifications dans le cerveau, de même que dans la plupart des noyaux des nerfs crâniens. Marinesco divise en trois phases les

modifications des cellules de la moelle qu'il a observées dans le botulisme : 1° raréfaction et disparition des éléments chromatophiles : les parties périphériques de la cellule sont plus modifiées que ses parties centrales ; 2° phase de désintégration granuleuse ou de chromatolyse : les corpuscules de Nissl se réunissent en agglomérations de différent volume et ensuite se réduisent en fine poussière ; les cellules perdent leur aspect stratifié et augmentent légèrement de volume, les prolongements protoplasmatiques se tuméfient ; 3° formation de lacunes à l'intérieur des cellules, à la suite de la destruction de la substance achromatique ; à cette période les contours des cellules sont sinueux, irréguliers, les bords des cellules nerveuses sont envahis par des cellules névrogliques hypertrophiées et hyperplasiées. Marinesco constate encore la coagulation du protoplasma des cellules nerveuses. Dans la plupart des cellules, le noyau et le nucléole restent intacts. Les modifications des cellules du bulbe s'arrêtent aux deux premières phases. Ces modifications portent sur des cellules du noyau du 12e nerf, *nucleus ambiguus*, sur les noyaux postérieurs du 10e nerf, sur les cellules des olives, sur le cervelet, *nucleus medianus*, sur les petites cellules des noyaux du 3e nerf. A mesure du développement du processus pathologique, le nombre des cellules névrogliques augmente par la voie directe. Ces cellules se disposent en chapelets ou bien par groupes, elles accomplissent le rôle des neuronophages, elles dévorent avec voracité les cellules nerveuses modifiées.

Marinesco insiste beaucoup sur cette fonction phagocytaire des cellules névrogliques ; selon lui, le rôle des leucocytes est insignifiant dans ces cas. On rencontrait quelquefois des foyers d'hémorrhagie à la base des cornes postérieures. Il a eu aussi l'occasion d'observer pour la première fois l'hémorragie intracellulaire (4).

Après Marinesco, ce sont W. Kempner et B. Pollack (5) qui ont étudié l'influence de la toxine botulinique sur le système nerveux central. Ils ont fait leurs expériences sur des chats, des lapins et des cobayes, auxquels ils faisaient des injections hypodermiques de la toxine qu'ils avaient préparée d'après la méthode de Brieger et Boer (6).

Les résultats des recherches de Kempner et de Pollack ne sont pas tout à fait les mêmes que ceux de Marinesco. (Marinesco

avait examiné les cerveaux des chats et des singes.) Ainsi ils ont observé une phase antérieure à la première phase de Marinesco (raréfaction des corpuscules de Nissl), et pendant laquelle les corpuscules de Nissl se tuméfient et prennent l'aspect de boulettes ; ensuite, ces corpuscules ainsi transformés perdent leur disposition concentrique dans le protoplasma des cellules. En outre, Kempner et Pollack n'ont pas pu observer l'augmentation du nombre de cellules névrogliques, constatée par Marinesco. C'est pourquoi il leur a été impossible de se prononcer sur la fonction phagocytaire de ces cellules. Pour le reste, ils sont à peu près d'accord avec Marinesco. Ils confirment que le processus pathologique commence par la périphérie de la cellule : cependant ils font remarquer que c'est par un pôle seulement que la modification débute, et non sur toute la périphérie à la fois. Ils ont observé la tuméfaction et la coloration du noyau et du nucléole, la coloration de ce dernier a été surtout intense. Pendant la dernière phase, la cellule est complètement détruite; cependant il est possible encore de distinguer son nucléole, souvent atrophié et situé sur la périphérie. Les cellules nerveuses se colorent en bleu très vif.

Il est intéressant de constater que les auteurs ont remarqué la différence dans l'évolution du processus pathologique selon l'animal. Ils attirent l'attention sur ce fait, que les cellules non plus que les groupes de cellules ne s'altèrent pas tous avec la même intensité. Cela s'observe aussi, mais avec moindre netteté, sur le système cérébro-spinal des chats, qui avaient subi une intoxication chronique par de petites doses de toxine ; Kempner et Pollack ont été amenés par leurs expériences à la conclusion que la toxine botulinique entre dans la série des toxines nerveuses (7). C'est ce qui a été confirmé par des expériences avec de l'antitoxine botulinique, préparée avec de la moelle des cobayes sains par Kempner et Schepilewsky (8).

C'est M. le professeur Metchnikoff qui m'a proposé d'entreprendre ces recherches sur l'effet de l'intoxication botulinique sur le système nerveux central, et c'est à son laboratoire de l'Institut Pasteur que j'ai fait mes expériences.

Dans le cours de ces recherches, je me suis servi des cobayes, des chats et des singes. Mon choix s'est porté de préférence sur ces animaux, pour deux raisons : 1° parce que, dans le botu-

lisme, ces animaux présentent les mêmes symptômes qu'on observe chez l'homme; et 2° parce que c'est aussi sur ces animaux que les observateurs précédents ont fait leurs expériences. Par conséquent, le contrôle des résultats devenait plus efficace.

C'est à l'amabilité de M. le Dr Morax que je dois la toxine avec laquelle je faisais mes expériences. C'était une toxine liquide, dont 1 millimètre cube tuait un petit cobaye (de 300 grammes) dans 3 jours. La solution était en raison de 1 millimètre cube pour 1 c. c. d'eau distillée. A cet effet, 0,10 c. c. étaient dissous dans 100 c. c. d'eau. Voici le résumé du journal de mes expériences.

Cobaye n° 1. — Poids, 500 grammes.

Le 9 *avril* 1900. — Injection hypodermique de 0,001 c. c. de toxine, c'est-à-dire 0,002 c. c. *par kilog.*

Le 10 *avril.* — Le cobaye est plus tranquille que d'habitude, triste; poids, 470 grammes. Sécrétion purulente dans les angles des yeux.

Le 11 *avril.* — Poids, 450 grammes. Conjonctivite.

Le 12 *avril.* — Poids, 480 grammes. Mollesse générale.

Le 13 *avril.* — Poids, 460 grammes. Mollesse. Déjections plus fines et plus sèches que d'habitude.

Le 14 *avril.* — Poids, 365 grammes. Faiblesse générale. Les fentes palpébrales rétrécies; mydriase; ne mange pas; absence de matières fécales; parésie des membres postérieurs. Reste immobile, la tête penchée.

Le 15 *avril.* — Poids, 330 grammes. Dyspnée avec tirage intercostal; la fente palpébrale presque imperceptible. Mort à midi. A vécu 6 jours depuis l'injection de toxine.

Cobaye n° 2. — Poids, 800 grammes.

Le 9 *avril* 1900. — Injection de 0,001 c. c. de toxine, c'est-à-dire 0,00125 c. c. *par kilog.*

Le 10 *avril.* — Le cobaye est plus tranquille que d'habitude, triste. Légère suppuration dans les angles des yeux. Poids, 755 grammes.

Le 11 *avril.* — Poids, 715 grammes. Conjonctivite. La tête est tournée à droite, à la suite de l'inégalité de la force tonique des muscles des deux côtés du cou. Mollesse générale.

Le 12 *avril.* — Poids, 715 grammes. La fente palpébrale droite est rétrécie.

Le 13 *avril.* — Poids, 695 grammes. Les excréments désagrégés et secs.

Le 14 *avril.* — Poids, 715 grammes. Faiblesse des membres postérieurs, principalement à droite.

Le 15 *avril.* — Poids, 665 grammes. Les deux fentes palpébrales rétrécies. Mollesse générale. Respiration, 64 par minute.

Le 16 avril. — Poids, 655 grammes.

Le 17 avril. — Poids, 585 grammes. Respiration, 60 par minute. Parésie des membres antérieurs et postérieurs droits. Constipation. Mydriase.

Le 18 avril. — Poids, 615 grammes. Parésie du membre antérieur droit plus accentuée. Respiration, 60 par minute.

Le 19 avril. — Poids, 600 grammes.

Le 21 avril. — Poids, 550 grammes. Hémi-parésie droite; le cobaye couché sur le côté droit ne peut pas se relever. Respiration irrégulière, 58 par minute, tirage des espaces intercostaux. La tête est tournée à droite et en bas. Les fentes palpébrales complètement fermées.

Le 23 avril. — Mort à 10 heures du matin. Poids, 520 grammes. Depuis l'injection de toxine, le cobaye a vécu 14 jours.

COBAYE N° 3. — Poids, 600 grammes.

Le 10 avril. — Injection hypodermique de 0,001 c. c. de toxine, c'est-à-dire 0,0017 c. c. *par kilog.*

Le 11 avril. — Poids, 590 grammes. Reste tranquille. Mydriase.

Le 12 avril. — Poids, 610 grammes. Mollesse générale.

Le 13 avril. — Poids, 575 grammes.

Le 14 avril. — Poids, 575 grammes.

Le 15 avril. — Poids, 520 grammes. Légère faiblesse des membres postérieurs.

Le 16 avril. — Poids, 525 grammes.

Le 17 avril. — Poids, 520 grammes. Respiration, 44 par minute. Mouvements respiratoires profonds. Faiblesse des membres postérieurs, surtout à droite.

Le 18 avril. — Poids, 535 grammes. Respiration, 52.

Le 19 avril. — Poids, 545 grammes. Suppuration dans les angles des yeux.

Le 21 avril. — Poids, 555 grammes. Mollesse générale, mais pas de faiblesse dans les membres postérieurs. Respiration, 72.

Le cobaye se rétablit promptement, de sorte que le 3 mai on ne constate aucun trouble. Poids, 705 grammes.

Le 3 mai. — Injection hypodermique de 0,0025 c. c. de toxine. Mort le 5e jour après l'injection.

COBAYE N° 4. — Poids, 400 grammes.

Le 10 avril. — Injection hypodermique de 0,001 c. c. de toxine, c'est-à-dire 0,0025 c. c. *par kilog.*

Le 11 avril. — Aucun symptôme caractéristique de l'intoxication botulinique.

Le 12 avril. — Poids, 395 grammes. Mollesse, inappétence. Mydriase.

Le 13 avril. — Poids, 360 grammes. Respiration accélérée, jusqu'à 150 par minute. Absence de selles.

Le 14 avril. — Poids, 360 grammes. Respiration irrégulière, reste assis la tête penchée en bas. Les fentes palpébrales fortement rétrécies.

Le 15 avril. — Mort à 10 heures du matin. Poids, 315 grammes. A vécu 5 jours après l'injection.

COBAYE n° 5. — Poids, 585 grammes.

Le 12 avril. — Injection hypodermique de 0,0018 c. c. de toxine, c'est-à-dire 0,003 c. c. *par kilog.*

Le 13 avril. — Poids, 575 grammes. Légère suppuration dans les angles des yeux.

Le 14 avril. — Poids, 605 grammes. Mollesse. Pupilles dilatées. Respiration, 136.

Le 15 avril. — Poids, 580 grammes. Respiration, 144. Les fentes palpébrales rétrécies. Parésie des membres postérieurs. Absence de selles.

Le 16 avril. — Poids, 550 grammes. A 10 heures du matin, on trouve l'animal dans des convulsions cloniques. Fort rétrécissement des fentes palpébrales. Respiration fréquente, irrégulière, avec râles. Hémiparésie droite. Mort à 11 h. 40 m. A vécu 4 jours après l'injection.

COBAYE n° 6. — Poids, 575 grammes.

Le 12 avril. — Injection hypodermique de 0,002 c. c. de toxine, c'est-à-dire 0,0035 *par kilog.*

Le 13 avril. — Poids, 565 grammes. Pus dans les angles des yeux.

Le 14 avril. — Poids, 595 grammes. Respiration, 140. Selles sèches et finement désagrégées.

Le 15 avril. — Poids, 565 grammes. Respiration, 150. Pupilles dilatées. Selles sèches et finement désagrégées.

Le 16 avril. — Poids, 535 grammes. Respiration, 140. Suppuration dans les angles des yeux. Pupilles dilatées, fentes palpébrales rétrécies. Faiblesse des membres postérieurs. Absence de selles.

Le 17 avril. — Poids, 495 grammes. Respiration, 140, irrégulière avec un fort tirage intercostal. Fentes palpébrales fortement rétrécies. La tête est penchée en bas. Traîne avec difficulté les membres postérieurs, surtout le membre droit. Couché sur le dos, le cobaye ne peut pas se redresser, il peut seulement se coucher sur le côté gauche.

Le 18 avril. — Poids 440 grammes.

Le 19 avril. — Est trouvé mort le matin. Poids, 410 grammes. A vécu 7 jours après l'injection.

COBAYE n° 7. — Poids, 675 grammes.

Le 12 avril. — Injection hypodermique de 0,0028 c. c. de toxine, c'est-à-dire 0,004 c. c. *par kilog.*

Le 13 avril. — Poids, 665 grammes

Le 14 avril. — Poids, 665 grammes. Pupilles dilatées. Légère lenteur dans les mouvements. Respiration, 58.

Le 15 avril. — Poids, 585 grammes. Respiration, 52. Suppuration dans les angles des yeux. Selles sèches et finement granuleuses.

Le 16 avril. — Poids, 550 grammes. Respiration, 40. Faiblesse générale. Absence de selles.

Le 17 avril. — Poids, 515 grammes. Respiration, 46. Faiblesse des membres postérieurs, surtout du membre droit.

Le 18 avril. — Poids, 495 grammes. Respiration, 50, irrégulière avec un fort tirage intercostal. Pupilles dilatées; rétrécissement des pentes palpébrales. Tête penchée en bas.

Le 19 avril. — Poids, 480 grammes. Respiration irrégulière, 30 par minute. Paralysie des deux membres postérieurs. Forte faiblesse générale.

Le cobaye est tué par la section des gros vaisseaux. Il était déjà tellement faible que probablement il n'aurait pas survécu jusqu'au soir. Il a vécu 7 jours après l'injection de la toxine.

On faisait l'autopsie de tous ces cobayes immédiatement après leur mort. L'axe cérébro-spinal était toujours soigneusement retiré et traité selon les besoins de l'examen microscopique. Je faisais cet examen seulement sur ceux des animaux qui mouraient sous mes yeux, afin que les cellules n'aient pas le temps de subir des modifications cadavériques. C'est pourquoi le système nerveux central des cobayes n°s 3 et 6 n'a pas été examiné.

A l'autopsie on rencontrait toujours une forte hypérémie des vaisseaux de la base du cerveau et de ceux des enveloppes de la moelle, surtout à la région lombaire et à la partie supérieure de la région dorsale; il y avait aussi de petits foyers d'hémorragie autour des vaisseaux hypérémiés; parfois les hémorragies pénétraient dans la substance même, et y produisaient des destructions en foyers miliaires.

Dans la description de la marche clinique de l'intoxication botulinique, c'est intentionnellement que je n'ai pas fait mention de la réaction des pupilles à la lumière. C'est que, selon moi, ce signe chez les cobayes ne peut pas être considéré comme un signe pathognomonique du botulisme, parce que, même chez les cobayes sains, la réaction pupillaire n'est pas bien nette, et elle est d'autant plus difficile à observer que l'iris chez ces animaux est très foncé. La mydriase non plus ne doit être relevée que dans les cas où elle est bien évidente, car les pupilles chez les cobayes sont habituellement larges.

D'après le journal de mes expériences, on voit que la marche clinique du botulisme chez les cobayes a été la même, à peu de variations près, quant à la durée de la maladie. Cette durée

dépend évidemment de deux causes : 1° de la dose de toxine injectée, et 2° de la force de résistance de l'animal. La résistance varie selon le sujet et peut, parfois, être assez importante; l'exemple nous en est fourni par le cobaye n° 3, qui a bien supporté une dose de toxine dont la moitié était mortelle pour d'autres cobayes.

Les symptômes de l'intoxication botulinique chez les cobayes sont les suivants :

1° Suppuration dans les angles des yeux;

2° Rétention et absence complète de selles;

3° Dilatation des pupilles;

4° Faiblesse générale, parésie et paralysie des membres, des muscles du cou, des paupières (rétrécissement des fentes palpébrales);

5° Respiration fréquente (*presque* dans tous les cas que nous avons observés) pendant les premiers jours de la maladie, ensuite respiration irrégulière avec tirage intercostal et moins fréquente;

6° Grande diminution du poids à mesure du développement de la maladie; cette diminution atteignait de 21 0/0 à 35 0/0 du poids primitif. Il n'y a que le cobaye n° 5 qui n'a vécu que 4 jours et chez lequel par conséquent la marche de l'intoxication fut très rapide; la diminution du poids n'a été que de 6 0/0.

En comparant ces symptômes avec ceux dont fait mention Van Ermengem, nous pouvons conclure que nos cobayes périssaient en effet à la suite de l'intoxication botulinique.

L'aspect du cobaye frappé par le botulisme est vraiment caractéristique : l'animal amaigri reste immobile, le museau tristement penché vers la terre (paralysie des muscles du cou et de la nuque); les yeux remplis de pus sont presque fermés; la respiration est pénible et irrégulière, avec tirage intercostal; les membres paralysés sont en abduction et demi-fléchis.

EXPÉRIENCES SUR DES CHATS

Chat n° 1. — Poids, 3,150 grammes.

Le 24 avril. — Injection hypodermique de 0,006 c. c. de toxine, c'est-à-dire 0,002 c. c. *par kilog.*

Les 25-27 avril. — Très lent. Reste dans la cage presque immobile, bâille, cligne les yeux.

Le 28 avril. — Poids, 2,910 grammes. Respiration, 20. Contractions cardiaques, environ 100 par minute. Rétention de selles. La réaction des pupilles est vive.

Le 2 mai. — Le chat se rétablit. Poids, 3,080 grammes. Respiration, 26-27.

Le 7 mai. — Poids, 3,310 grammes. Rien d'anormal.

Le 10 mai. — Introduction par la bouche de 0,009 c. c. de toxine dissoute dans 9 c. c. de lait.

Le 15 mai. — Poids, 2,680 grammes. Respiration, 32. Contractions cardiaques, 108. Suppuration dans les angles des yeux.

Le 16 mai. — Poids, 2,610 grammes. Respiration, 24. Contractions cardiaques, 110. Ecoulement du nez d'une sécrétion purulente. Eternue souvent.

Le 17 mai. — Poids, 2,525 grammes. Respiration, 20. Contractions cardiaques 114. Respiration difficile, irrégulière. Les fentes palpébrales rétrécies, l'œil droit est presque complètement fermé. Suppuration dans les angles des yeux, les pupilles dilatées, mais réagissent à la lumière. Eternue à tout moment. La troisième paupière est sortie. Sécrétion suppurée du nez continue. Rétention des déjections. Faiblesse générale, tremblement.

Le 18 mai. — Poids, 2,465 grammes. Respiration, 28. Contractions cardiaques, 90.

Le 19 mai. — Poids, 2,420 grammes. Respiration, 22. Contractions cardiaques, 150. La sécrétion de la muqueuse nasale est moindre. Des ecchymoses sur la troisième paupière.

Le 21 mai. — Poids, 2,565 grammes. Respiration, 16. Contractions cardiaques 120. Le chat se rétablit. Mange avec appétit.

Le 23 mai. — Poids, 2,580 grammes. Respiration, 15. Contractions cardiaques 124. Plus de sécrétion purulente ni dans le nez, ni dans les yeux. Bientôt ce chat a atteint son poids initial et guérit complètement.

Chat n° 2. — Poids, 1,870 grammes.

Le 3 mai. — Injection hypodermique de 0,0055 c. c. de toxine, c'est-à-dire 0,003 c. c. par kilog.

Le 4 mai. — Poids, 1,870 grammes. Les pupilles, larges, réagissent lentement à la lumière. Nystagmus sous forme de légers tremblements des globes oculaires. Légère exophtalmie.

Le 5 mai. — Nystagmus très prononcé. Exophtalmie. Dilatation des pupilles, faible réaction à la lumière. Petits tremblements généraux. Respiration, 16. Contractions cardiaques, 72.

Le 7 mai. — Poids, 1,750 grammes. Respiration irrégulière, 34. Contractions cardiaques, 84. Tout le temps miaule d'une voix rauque. Grande inappétence. Rétention des déjections ; les autres phénomènes se manifestent comme précédemment.

Le 9 mai. — Poids, 1,625 grammes. Très forte dilatation des pupilles, très faible réaction à la lumière. Nystagmus. Sortie de la troisième paupière. La fente palpébrale gauche est rétrécie. Pus dans les angles des yeux. Respiration irrégulière avec ronflement, 28 par minute. Contractions cardiaques, 88,

irrégulières. Faiblesse générale. Pendant les déplacements, traine légèrement le membre postérieur gauche.

Le 10 *mai.* — Respiration, 30. Contractions cardiaques, 136. Respiration irrégulière, difficile, avec tirage intercostal.

Le 12 *mai.* — Poids, 1,435 grammes. Respiration, 30. Contractions cardiaques, 132. Rétrécissement des fentes palpébrales. Parésie des membres postérieurs, surtout du membre gauche. Voix rauque; respiration accompagnée de râles. Nystagmus. Pupilles dilatées et réagissant faiblement à la lumière. Suppuration des yeux. Ne mange pas depuis le 10 mai.

Le 14 *mai.* — Poids, 1,375 grammes. Respiration, 26. Contractions cardiaques, 84. Tous les autres phénomènes se manifestent comme pendant les jours précédents.

Le 15 *mai.* — Poids, 1,290 grammes. Respiration, 24. Contractions cardiaques, 162 (?). Le nystagmus est plus faible. Les fentes palpébrales presque complètement fermées. La troisième paupière est fortement injectée.

Le 16 *mai.* — Poids, 1,240 grammes. Respiration, 36, avec un fort tirage intercostal, toutes les deux inspirations. Contractions cardiaques, 90. Tout le reste comme précédemment.

Le 17 *mai.* — Poids, 1,200 grammes. Respiration, 32. Contractions cardiaques, 94. Les fentes palpébrales fermées; réaction des pupilles à la lumière est très faible. Léger nystagmus, les yeux suppurent; des ecchymoses sur la troisième paupière. Respiration pénible : une inspiration profonde avec un fort tirage intercostal succède à une inspiration superficielle. Contractions cardiaques irrégulières. Parésie des membres postérieurs. Faiblesse générale et tremblement. Les mouvements de la langue paraissent être libres.

Le 18 *mai.* — Poids, 1,155 grammes. Respiration, 26, irrégulière, difficile. Contractions cardiaques faibles, 120. Reste couchée, anéantie, avec les yeux ouverts. Les pupilles sont légèrement dilatées, ne réagissent presque pas à la lumière. Placée debout, fait péniblement quelques pas et tombe. Est sacrifiée par section des carotides. Depuis l'injection, a vécu 15 jours.

CHAT Nº 3. — Poids, 2,515 grammes.

Le 22 *mai.* — Injection hypodermique de 0,010 c. c. de toxine, c'est-à-dire 0,004 c. c. par 10 kilogs.

Le 23 *mai.* — Poids, 2,425 grammes. Respiration, 28. Contractions cardiaques, 105. Légère faiblesse générale.

Le 25 *mai.* — Poids, 2,460 grammes. Respiration, 25. Contractions cardiaques, 112. Pupilles dilatées réagissent à la lumière. Légère sécrétion purulente de la muqueuse nasale. La fente palpébrale gauche est légèrement rétrécie.

Le 28 *mai.* — Poids, 2,500 grammes. Respiration, 28. Contractions cardiaques, 100. Léger écoulement nasal. Plus rien d'anormal.

Le 29 *mai.* — Seconde injection hypodermique de toxine à la même dose que la première.

Le 30 *mai.* — Poids, 2,420 grammes. Respiration, 23. Contractions cardiaques, 88. Légère faiblesse générale. Les pupilles sont dilatées, leur réac-

tion à la lumière est affaiblie. Suppuration dans les angles des yeux. Sécrétion purulente du nez. Respiration difficile. Voix rauque.

Le 31 *mai.* — Poids, 2,460 grammes. Respiration, 27. Contractions cardiaques, 110. Les autres phénomènes comme précédemment.

Le 1er *juin.* — Poids, 2,405 grammes. Respiration, 22, avec tirage intercostal. Contractions cardiaques, 112, irrégulières.

2-4 *juin.* — Sensible amélioration de tous les symptômes. Poids, 2,515 grammes. Nouvelle injection de 0,012 c. c. de toxine, c'est-à-dire 0,0043 c. c. par kilog.

5-6 *juin.* — Seconde injection ne produit aucun effet. Poids, 2,525 grammes. Encore une injection de 0,020 c. c. de toxine, c'est-à-dire 0,008 c. c. par kilog.

7-13 *juin.* — Aucun effet, sauf la diminution du poids. Le 7 juin, le chat pesait 2,480 grammes. Quatrième injection hypodermique de 0,09 c. c. de toxine dans 30 c. c. d'eau, c'est-à-dire environ 0,035 c. c. par kilog.

Le 15 *juin.* — Poids, 2,530 grammes. Léger écoulement purulent du nez.

Le 22 *juin.* — Poids, 2,435 grammes. Contractions cardiaques pas bien régulières. Pupilles dilatées, leur réaction à la lumière est lente. Légère exophtalmie.

Le 23 *juin.* — Poids, 2,525 grammes. Très léger tremblement général.

Les jours suivants tous les symptômes s'amendèrent, et le chat s'est complètement rétabli.

D'après ces expériences, on voit que les chats présentaient parfaitement les symptômes pathognomoniques du botulisme. Le n° 2 en est mort.

Aux symptômes qu'on avait observés chez les cobayes il faut ajouter certains phénomènes oculaires qui se produisent avec beaucoup de netteté, et qui étaient déjà signalés par *Ermengem* et par d'autres observateurs; ces phénomènes sont : forte dilatation des pupilles, sortie de la troisième paupière ; en outre la voix rauque, et la sécrétion suppurée du nez.

A remarquer, fort nystagmus chez le chat n° 2, et légère exophtalmie chez les chats n° 2 et n° 3.

Quant à la réaction des pupilles à la lumière, je n'ai jamais pu constater sa complète disparition.

Le chat n° 2 a perdu 39 0/0 de son poids. Tous les trois avaient reçu la même toxine. Évidemment leur force de résistance était fort différente. Les expériences sur les chats n° 1 et n° 3 montrent que les chats sont très résistants à la toxine botulinique et les injections répétées produisent une grande tolérance pour le botulisme, de sorte qu'on peut augmenter les doses de la toxine.

A l'autopsie du chat n° 2, on constata l'hyperémie des vaisseaux de la base du cerveau et de légères hémorragies dans les enveloppes des méninges de la même région.

EXPÉRIENCES SUR LES SINGES

Singe n° 1, mâle de l'espèce *Semnopithecus*. Poids 1,510 grammes.

Le 29 mai. — Injection hypodermique de 0,0015 c. c. de toxine, c'est-à-dire, 0,001 par kilogramme.

Le singe est transporté, d'une grande cage où il se trouvait avec un autre singe, dans une cage plus petite.

Il s'ennuie et ne mange pas volontiers.

Le 30 mai. — Poids, 1,425 grammes.

Le 31 mai. — Poids, 1,330 grammes. Plus rien d'anormal.

Le 1er juin. — Poids, 1,315 grammes. Est transporté de nouveau dans la grande cage avec son camarade.

Le 4 juin. — Poids, 1,570 grammes. Une seconde injection de 0,0025 c. c. de toxine, c'est-à-dire environ 0,0017 c. c. par kilogramme. De nouveau isolé dans la petite cage.

Le 5 juin. — Poids, 1,365 grammes.

Le 6 juin. — Poids, 1,295 grammes. Mais on ne constate aucun symptôme de botulisme, c'est pourquoi on fait une troisième injection, de 0,0046 c. c. de toxine, coupée avec de l'eau à raison de 0,2 : 100; ce qui fait 0,0035 c. c. de toxine par kilogramme. Le singe est laissé dans la grande cage.

Le 7 juin. — Poids, 1,340 grammes.

Le 13 *juin.* — Quatrième injection de 0,030 c. c. de toxine, c'est-à-dire plus de 0,020 c. c. par kilogramme. Solution de 0,3 : 100.

Le 15 juin. — Poids, 1,410 grammes. Introduction par la bouche de 1 c. c. de toxine pure.

Le 16 juin. — Poids, 1,385 grammes.

Le 22 juin. — Poids de 1,390 grammes. Dans quelques jours le singe atteint son poids primitif. Aucun symptôme de botulisme. Plus tard, ce singe a servi pour d'autres expériences.

Singe n° 2. — Femelle de l'espèce de *Semnopithecus*. Poids, 1,630 grammes.

Le 11 juin. — Injection hypodermique de 0,0065 c. c. de toxine, c'est-à-dire 0,004 c. c. par kilogramme. Pendant les deux jours suivants, aucun symptôme d'intoxication.

Le 13 juin. — Poids, 1,590 grammes. Seconde injection hypodermique de 0,015 c. c. de toxine, c'est-à-dire, 0,01 c. c. par kilogramme. Aucun symptôme d'intoxication. Le singe a servi plus tard pour d'autres expériences.

D'après Ermengem, les singes seraient des plus sensibles à la toxine botulinique. La marche de cette maladie est très rapide chez eux, ils succombent au bout de 1 ou 2 jours. C'est pourquoi la grande tolérance de mes singes envers la toxine fut imprévue

pour moi, et j'ai dû en rechercher la cause. Selon moi il pouvait y en avoir deux : 1° ou bien la toxine que j'employais avait perdu sa virulence; 2° ou bien mes singes appartenaient à une espèce qui serait réfractaire au botulisme. Pour contrôler la force de la toxine, j'en ai injecté à 2 cobayes, un de 685 grammes, l'autres de 460 grammes. Le premier a reçu 0,002 c. c., le second 0,001 c. c. de toxine. Tous les deux succombèrent le 8e jour après avoir présenté tous les symptômes du botulisme.

On pouvait donc conclure que si la force de la toxine avait un peu diminué, en tout cas les doses qu'on avait injectées aux singes étaient bien suffisantes pour les empoisonner, si les singes étaient vraiment sensibles à ce virus. Ermengem a fait ses expériences sur une autre espèce de singe, sur les Macacus Rhesus. J'ai donc pris la résolution de continuer mes expériences sur cette même espèce.

SINGE N° 3. *Macacus Rhesus*, femelle. — Poids, 1,760 grammes.

Le 25 juin. — Introduction par la bouche de 1 c. c. de toxine pure, c'est-à-dire 568 mm. c. par kilogramme. Pendant les 2 jours suivants aucun symptôme d'intoxication.

Le 27 juin. — Poids, 1,840 grammes. Seconde introduction par la bouche de 5 c. c. de toxine pure. Pendant les 2 jours suivants aucun symptôme d'intoxication.

Le 29 juin. — Injection hypodermique de 1 c. c. de toxine pure.

Le 30 juin. — Vers les 9 heures du matin le singe est dans un état désespéré : il est couché sur le côté, la langue sortie. Les fentes palpébrales presque complètement fermées. Mort à 9 heures du matin.

SINGE N° 4. *Macacus Rhesus*, mâle. — Poids 1,725 grammes.

Le 27 juin. — Injection hypodermique de 0,015 c. c. de toxine, c'est-à-dire environ 0,009 c. c. par kilogramme. Aucun symptôme d'intoxication pendant les 2 jours suivants.

Le 29 juin. — Injection hypodermique de 1 c. c. de toxine pure.

Le 30 juin. — A 8 heures du matin a été trouvé mort.

D'après ces expériences on peut conclure que les Macacus Rhesus ne sont pas très sensibles à la toxine botulique, puisqu'ils en supportent impunément de grandes doses. Mais, dès qu'ils sont frappés par la maladie, ils succombent rapidement. C'est ce qui a été arrivé aussi aux singes d'Ermengem.

Chez mes singes la maladie se déclarant le soir, il m'est donc impossible de décrire la marche clinique du botulisme chez les singes. Je puis seulement signaler que l'expression du

visage du singe qui mourut sous mes yeux, ainsi que de celui que j'ai trouvé déjà mort, concordait exactement avec la photographie du singe mort de botulisme, photographie qu'on trouve dans le travail d'Ermengem.

A l'autopsie de mes singes faite immédiatement après leur mort, on constata l'hypérémie des vaisseaux cérébraux, surtout de ceux de la base du cerveau ; la substance grise de la moelle, principalement aux régions lombaire et cervicale, a été presque rouge.

Après l'autopsie, l'axe cérébro-spinal de tous ces animaux péris par le botulisme a été traité par l'alcool et fixé dans de la paraffine. La coloration a été faite d'après la méthode de Nissl, avec cette modification que le bleu de méthylène fut remplacé par la solution saturée de toluidine ; cela simplifie les manipulations de la coloration et donne d'excellents résultats. Les coupes sur l'axe cérébro-spinal ont été faites aux différents niveaux : sur la moelle (à 8 ou 10 niveaux différents), sur le bulbe, le cervelet et l'écorce du cerveau. Elles avaient 10 microns d'épaisseur. Pour pouvoir comparer et mieux apprécier les altérations pathologiques qu'on rencontrait sur les coupes des animaux morts de botulisme, je faisais parallèlement des préparations prises aux niveaux correspondants sur le système cérébro-spinal des animaux sains (les singes de la même espèce Macacus Rhesus), et j'employais toujours le même procédé de coloration.

Les lésions pathologiques, relevées par l'examen microscopique du système nerveux central des animaux succombés au botulisme, sont des plus graves. Les altérations portaient sur les cellules nerveuses, leurs prolongements et les vaisseaux. J'ai trouvé comme Marinesco que c'est surtout la substance grise de la moelle qui était frappée; ensuite viennent, dans l'ordre du degré des lésions, le bulbe, le cervelet et l'écorce des hémisphères. La moelle portait les lésions sur toute sa longueur, mais elles étaient surtout prononcées au niveau des centres des membres (diverses parésies et paralysies partielles).

Les cellules des cornes antérieures et des parties centrales de la substance grise de la moelle étaient plus altérées que celles des cornes postérieures. De fortes lésions se rencontraient aussi dans les cellules des ganglions de la moelle.

Dans le bulbe et dans l'isthme cérébral c'étaient surtout les cellules des noyaux des 12e, 10e et 3e paires de nerfs crâniens, celles des colonnes latérales et des noyaux rouges qui étaient le plus changées, bien que les autres noyaux de la substance grise n'étaient pas non plus complètement exempts de toute lésion. Dans le cervelet, c'étaient surtout les cellules de Purkinye qui avaient subi certains changements. Quant aux cellules de l'écorce du cerveau, je n'ai pas remarqué que les lésions se localisaient plutôt dans certaines d'elles que dans d'autres.

Je suis de l'avis de Kempner et de Pollack, que le processus des modifications pathologiques dans les cellules différait légèrement selon l'animal.

Voici quels sont les changements que j'ai observés dans les cellules nerveuses de la moelle des cobayes : tuméfaction de la substance chromatophile des cellules : le protoplasma perdait son aspect strié et la stratification des couches de la substance chromatophile était dérangée. Cette phase de changements a été révélée par Kempner et Pollack, tandis que Marinesco n'en a pas fait mention.

Par suite de la tuméfaction et du changement de la disposition normale, les corpuscules de Nissl prennent l'aspect de boulettes irrégulières. La substance chromatophile du protoplasma des cellules qui, à l'état normal, a l'aspect de graines plus ou moins régulières et rondes, se transforme en boulettes irrégulières.

Pendant la phase suivante, les corpuscules de Nissl tuméfiés et changés de forme se désagrègent, de sorte que le protoplasma des cellules devient finement granuleux.

En même temps, la substance chromatophile du protoplasma se dissout peu à peu dans la substance achromatophile : cette dernière commence aussi à se colorer, de sorte que les boulettes bleu foncé, restes des corpuscules de Nissl, se trouvent sur le fond bleu clair constitué par la substance achromatophile.

Ce phénomène commence à la périphérie et se propage promptement sur toute la cellule. Le plus souvent, comme Kempner et Pollack l'ont aussi constaté, le processus débute non sur toute la périphérie de la cellule, mais sur l'un de ses pôles seulement.

La substance chromatophile désagrégée continue à se

dissoudre dans le protoplasma et finit par disparaître. A cette période, le protoplasma a l'aspect homogène. Ce processus n'a pas lieu non plus dans la cellule tout entière : une partie seulement des éléments s'accumule dans une moitié de la cellule ; c'est pourquoi cette dernière à cette phase n'est pas colorée uniformément : la moitié ou un tiers est presque homogène et d'un bleu pâle, tandis que le reste est d'un bleu saturé et finement granuleux ; si le noyau et le nucléole se trouvent dans cette partie qui est d'un bleu foncé, on les distingue difficilement.

Plus tard le protoplasma se colore en bleu pâle, mais il reste tout de même légèrement granuleux, bien que les grains de la substance chromatophile soient finement désagrégés.

Chez les cobayes morts de botulisme, l'aspect parfaitement homogène du protoplasma des cellules nerveuses se rencontre plus rarement que chez d'autres animaux.

Simultanément à la désagrégation de la substance chromatophile du protoplasma cellulaire, se produisent la modification de la forme de la cellule et la perte de sa qualité en tant que neurone.

Les prolongements cellulaires se déforment, se ratatinent et disparaissent ; les contours de la cellule deviennent irréguliers, sinueux ; souvent les sinus sont très profonds ; de nombreuses cellules se vacuolisent ; les vacuoles occupent souvent plus de la moitié de la cellule.

Enfin, dans les dernières phases du processus, la cellule se désagrège complètement, on ne trouve à sa place qu'un groupe de points (vestiges de la substance chromatophile de la cellule), dont la disposition permet, parfois, de deviner l'ancienne place de la cellule.

Marinesco dit que, dans l'empoisonnement par la toxine botulinique, le noyau et le nucléole de la plupart des cellules restent intacts. Cela est vrai en tant qu'il s'agit des cellules du bulbe, du cervelet et de l'écorce des hémisphères, où le processus pathologique n'est pas aussi avancé que dans la moelle épinière. Quant aux cellules de cette dernière, chez les cobayes (en ce qui concerne les chats et les singes, voir plus loin), je n'ai presque pas rencontré de cellules altérées dans lesquelles le noyau soit sain.

L'altération du noyau d'abord, et du nucléole ensuite, com-

mence presque simultanément avec les modifications du protoplasma.

A l'examen microscopique de l'axe cérébro-spinal des cobayes, je n'ai pas observé, contrairement à ce qu'ont trouvé Kempner et Pollack, la tuméfaction du noyau de la cellule nerveuse. Un des premiers signes de l'état morbide du noyau est, selon moi, sa coloration. Pendant la phase de la désagrégation de la substance chromatophile du protoplasma, les noyaux de toutes les cellules nerveuses se colorent en bleu foncé; le nucléole, à cette période, apparaît le plus souvent tuméfié et toujours coloré en bleu intense. Le noyau, diminué en son volume, entoure le nucléole tuméfié sous forme d'un mince anneau bleu.

Dans les phases plus avancées, on voit un gros nucléole bleu foncé, et souvent il est impossible de distinguer le noyau atrophié.

Au fur et à mesure que le processus pathologique, se produisant dans le protoplasma de la cellule nerveuse, dans son noyau et son nucléole, s'avance, le noyau et le nucléole quittent leur place habituelle dans le protoplasma, et se dirigent vers la périphérie de la cellule.

Dans les cas où il est impossible de distinguer le noyau atrophié, on trouve sur la périphérie le nucléole fortement coloré. Enfin, on rencontre beaucoup de cellules à la phase finale dans lesquelles on ne trouve ni noyau ni nucléole.

Dans le bulbe, j'ai rencontré très peu de cellules vacuolisées; dans l'isthme cérébral il n'y en avait pas. Les cellules de Purkinye ainsi que les cellules de l'écorce des hémisphères étaient très légèrement modifiées : on constatait la tuméfaction des corpuscules de Nissl et le commencement de leur désagrégation. Les cellules des ganglions intervertébraux subissaient les mêmes modifications que les cellules de la moelle épinière, seulement à un moindre degré; il n'y avait pas encore de vacuoles dans les cellules.

L'examen microscopique de l'axe cérébro-spinal des chats succombés au botulisme a permis de constater une différence quant à la marche du processus pathologique dans les cellules nerveuses. Les modifications dans la substance chromatophile apparaissent distinctement d'abord à l'un des pôles de la cellule, se propagent ensuite à toute sa périphérie et atteignent enfin

les parties centrales de la cellule; la chromatolyse est plus achevée que chez les cobayes; le protoplasma de la plupart des cellules est complètement homogène et se colore en bleu pâle; les cellules sinueuses et vacuolisées sont plus rares; le noyau et le nucléole sont moins modifiés que chez les cobayes et conservent plus longtemps leur aspect normal (Marinesco); on observe aussi la phase où la tuméfaction du noyau se produit (Kempner et Pollack).

Les changements pathologiques chez les singes sont le produit d'un processus morbide très énergique, puisque les singes ne vécurent que vingt heures après l'injection de toxine. C'est pourquoi on ne peut pas s'attendre à rencontrer chez eux des altérations aussi avancées que celles qu'on avait observées chez les cobayes, surtout la même quantité de cellules nerveuses modifiées.

Et en effet, dans l'axe cérébro-spinal des singes, on rencontre peu de cellules aux contours sinueux, et encore moins de cellules vacuolisées; tandis que souvent chez les cobayes presque toutes les cellules des cornes antérieures sont vacuolisées et sinueuses. Par contre, les premières phases des modifications pathologiques se produisent avec une grande netteté: les corpuscules de Nissl gonflés prennent l'aspect de boulettes irrégulières, aux contours vagues, et perdent leur disposition habituelle dans le protoplasma. On observe très facilement à la périphérie du noyau une zone formée par l'agglomération des corpuscules de Nissl. Il m'est impossible de dire si le noyau se tuméfie, en tout cas à cette phase il se colore en bleu et semble être plein et sphérique. Plus tard survient la désagrégation et la dissolution de la substance chromatophile de la cellule. Mais chez les singes le processus ne commence pas immuablement par la périphérie de la cellule. On rencontre des cellules avec la chromatolyse centrale nettement prononcée. Quant aux autres modifications cellulaires qu'on rencontre chez les singes, elles sont identiques à celles qu'on a observées chez les cobayes.

La localisation des modifications pathologiques dans le système nerveux central est la même chez les cobayes, les chats et les singes. Les cobayes, dans mes expériences, succombaient après l'injection dans un espace de temps différent. La durée plus longue de la maladie favorisait l'évolution du processus

pathologique dans le système nerveux central; les modifications dans ces cas étaient plus étendues et plus avancées. Quant au caractère de la lésion, il a toujours été le même.

J'ai déjà dit qu'à l'autopsie des animaux succombés du botulisme on trouvait l'hyperémie des vaisseaux de la moelle. A cette hyperémie des vaisseaux superficiels correspondait celle des vaisseaux profonds dont les parois étaient distendues au maximum. Outre l'hyperémie on constatait des hémorragies dans la substance même de la moelle, dans la substance grise aussi bien que dans la substance blanche. Ainsi, par exemple, dans un cas, l'hémorragie a détruit presque toute la base de la corne antérieure; dans un autre la région postérieure du ganglion des faisceaux cunéiformes et graciles (*gracilis*) d'un côté. Chez les cobayes on rencontrait du sang aussi dans le troisième ventricule; cependant je n'ai pas remarqué que les parois de ce dernier fussent détruites. Les cellules nerveuses, à l'endroit où a eu lieu l'hémorragie, étaient profondément modifiées; dans le foyer même de l'hémorragie et dans son voisinage immédiat, on voyait de nombreuses cellules migratrices. Dans les vaisseaux hyperémiés ainsi qu'en dehors d'eux on rencontrait aussi beaucoup de globules blancs. Dans les vaisseaux il y avait parfois une agglomération de ces globules. Les cellules nerveuses situées près des vaisseaux étaient toujours modifiées.

Jusqu'à présent je n'ai rien encore dit au sujet d'un phénomène qui se manifestait très distinctement dans le système nerveux central de tous les animaux sur lesquels j'ai fait mes expériences avec la toxine botulinique. J'attribue à ce phénomène une grande importance, c'est pourquoi je lui ai réservé une place à part; il s'agit de la phagocytose. Ce phénomène nous explique, au point de vue biologique, la marche du processus pathologique; en observant ce phénomène, nous voyons parfaitement la façon dont l'organisme soutient la lutte pour l'existence, en détruisant lui-même ceux de ses éléments qui sont devenus inutiles, inaptes à fonctionner et peut-être même nuisibles. Ce qui attira surtout notre attention, c'est la présence sur les préparations d'une grande quantité d'éléments migrateurs soit longs, soit allongés, que l'on rencontre non seulement le long des vaisseaux, mais aussi dans tout le champ visuel du microscope. Par endroit ces éléments forment des aggloméra-

tions, ou bien ils se réunissent en chapelet. Leur manière de se comporter envers les cellules nerveuses est variable : tantôt ils entourent seulement la cellule sans la toucher, tantôt ils s'attachent à sa surface, ils l'entourent de tous côtés, ils pénètrent dans son intérieur, ils se trouvent dans les sinus de la cellule, ils remplissent ses vacuoles par groupe ou isolément. Le degré de modification qu'a subi la cellule a une influence incontestable sur ses rapports avec les éléments migrateurs; ces derniers ne s'accumulent pas sur les cellules non modifiées, ils se tiennent simplement dans son voisinage. Même les cellules, dans les premières phases du processus morbide (tuméfaction des corpuscules de Nissl), sont habituellement respectées par les éléments migrateurs, qui ne s'attaquent qu'à des cellules gravement atteintes, probablement incapables de se rétablir.

C'est pourquoi les cellules migratrices s'empressent d'en débarrasser l'organisme. La pénétration de ces éléments à l'intérieur de la cellu'e nerveuse provoque une certaine réaction de la part du protoplasma, une réaction qui se manifeste par la perte de l'état granuleux de ce dernier à l'endroit contigu à l'élément migrateur qui semble le liquéfier.

On rencontrait aussi des cellules à moitié détruites. Cet état des cellules faisait paraître plus grand l'espace péricellulaire. Cet espace, occupé jadis par le corps de la cellule, était rempli maintenant par les éléments migrateurs. On ne voyait pas ces éléments dans les cellules vacuolisées qui avaient définitivement péri; cependant, dans la plupart des cas, on les trouvait dans le voisinage. Les cellules à moitié détruites, ou plutôt les restes de cellules, n'étaient plus capables d'accomplir aucune fonction, et peut-être est-ce pour cela qu'elles étaient abandonnées par les éléments migrateurs.

De tout ce que nous venons d'exposer il suit que, dans l'intoxication botulinique, le phénomène de phagocytose se produit dans le système nerveux central comme il se manifeste aussi dans d'autres organes et sous l'influence d'autres causes. La pénétration des éléments migrateurs dans l'intérieur des cellules, leur présence dans les sinus et dans les vacuoles, me fait supposer que, dans l'intoxication botulinique, la phagocytose est un des principaux agents de la formation de ces sinus et de ces vacuoles. A l'appui de cette supposition vient encore ce fait que plusieurs

vacuoles vides d'éléments migrateurs ne sont pas complètement closes : ce sont plutôt de profonds sinus piriformes ou ronds, à l'entrée desquels se tiennent les éléments migrateurs qui avaient peut-être quitté l'intérieur de la cellule. La plus intense phagocytose, dans mes expériences, se rencontrait dans la moelle, et la plus faible dans le cervelet et l'écorce du cerveau.

Je veux dire encore quelques mots sur la nature des éléments migrateurs exerçant le rôle des phagocytes dans le système nerveux central des animaux succombés au botulisme. Marinesco se prononce à ce sujet d'une façon absolue dans son travail que nous avons cité plus haut. Selon lui, dans l'intoxication botulinique, le rôle phagocytique des leucocytes serait tout à fait insignifiant, et c'est aux cellules névrogliques qu'incomberait la fonction des *neuronophages*. On ne peut pas contester aux cellules névrogliques cette faculté, qui d'ailleurs est propre aux différentes espèces de cellules, ce qui a été démontré depuis longtemps par M. Metchnikoff.

Cependant je ne vois pas de raison pour laquelle, dans l'intoxication botulinique, on exclurait les leucocytes, puisque les vaisseaux prennent part au processus pathologique qui se produit dans le système nerveux central. D'ailleurs, au moins la moitié des éléments migrateurs qu'on rencontre dans ce système a l'aspect tout à fait caractéristique des leucocytes.

Pour ma part, je suis de l'avis que la phagocytose dans le botulisme est produite autant par les leucocytes que par les cellules névrogliques. En faveur des leucocytes plaide encore ce fait qu'on trouve un grand nombre d'éléments migrateurs dans le système cérébro-spinal des singes, alors que ces derniers n'ont vécu que 20 heures après l'injection de la toxine. Eh bien, tout en admettant que les cellules névrogliques peuvent se multiplier avec une telle rapidité, on est saisi d'un certain doute en examinant bien les préparations des coupes prises sur l'axe cérébro-spinal des singes : on y rencontre peu de cellules disposées en chapelet, et c'est cette disposition qui indiquerait la multiplication rapide des cellules névrogliques par voie directe (Marinesco).

Il me semble aussi qu'il faudrait reconnaître que les cellules névrogliques non-seulement exercent les fonctions de neuronophages, mais qu'en outre elles comblent les vides produits

dans le système cérébro-spinal par perte des éléments nerveux.

Mon travail aboutit à ces conclusions : la toxine botulinique provoque chez les cobayes, les chats et les singes, les symptômes caractéristiques de la maladie, qui se manifestent principalement par les signes d'origine centrale : le processus pathologique est d'une grande violence, il donne l'explication des graves symptômes cliniques. Ce processus consiste en modifications profondes dans les vaisseaux et les cellules nerveuses. La phagocytose joue ici un rôle important. Je ne vois pas de raisons suffisantes pour lesquelles les altérations qu'on observe dans les cellules nerveuses, produites par la toxine botulinique, puissent être considérées comme spécifiques au botulisme et différentes des modifications produites par toute autre toxine, tétanique ou diphtéritique, par exemple. Il est possible que dans le botulisme les changements soient plus intenses et plus étendus.

En terminant, je m'empresse d'exprimer ma profonde reconnaissance à M. Metchnikoff pour ses conseils, pour le vif intérêt qu'il m'a toujours témoigné pendant l'exécution de ces recherches qu'il a bien voulu guider.

Je remercie aussi bien cordialement M. le docteur Morax pour avoir mis à ma disposition la toxine botulinique avec laquelle j'ai fait mes expériences.

EXPLICATION DES PLANCHES VI ET VII

Fig. 1 *a et* 2 *b*. — Une cellule presque homogène portant de nombreux phagocytes, et 2 cellules aux corpuscules de Nissl désagrégés, portant aussi de nombreux phagocytes qui, en partie, pénètrent dans la substance même de la cellule. (Moelle d'un cobaye.)

Fig. 2. — Cellule dont le noyau se trouve à la périphérie ; le noyau, sous forme d'un mince anneau bleu, entoure le nucléole tuméfié. (Moelle d'un cobaye.)

Fig. 3. — Groupe de cellules de la corne antérieure : la cellule du milieu est fortement vacuolisée ; à droite, une cellule a la substance chromato-

phile désagrégée et irrégulièrement répartie, cette cellule porte un prolongement modifié; à gauche, une cellule a la substance chromatophile désagrégée, on ne distingue pas de noyau dans cette cellule; toutes les trois cellules sont déformées et sinueuses; en bas — traces de l'ancienne cellule sous forme de restes de la substance chromatophile désagrégée. (Moelle d'un cobaye.)

Fig. 4 et 5. — Des cellules vacuolisées et sinueuses de la corne antérieure; à l'entrée d'une vacuole de la cellule nº 5 se trouvent les phagocytes. (Moelle du cobaye.)

Fig. 6. — Des cellules profondément déformées avec des phagocytes dans leur intérieur. (Moelle d'un cobaye.)

Fig. 7. — Une partie de la corne antérieure avec des cellules profondément modifiées : dans les sinus de certaines cellules se trouvent des phagocytes; de certaines autres cellules il ne reste que des traces de la substance chromatophile.

Fig. 8. — Une partie de la corne antérieure de la moelle d'un cobaye; près de ces cellules détruites on voit les phagocytes; par places le tissu nerveux est remplacé par des cellules névrogliques.

Fig. 9. — Groupe de phagocytes dans les vacuoles des cellules nerveuses des parties centrales de la corne antérieure de la moelle d'un cobaye.

Fig. 10. — Cellules du noyau rouge d'un chat; chromatolyse, on voit distinctement la chromatolyse périphérique.

Fig. 11. — Une cellule de la corne antérieure de la moelle d'un chat; le protoplasma de la cellule est parfaitement homogène.

Fig. 12. — Une cellule de la corne antérieure de la moelle d'un singe; tuméfaction des corpuscules de Nissl; ils s'accumulent et se disposent autour du noyau coloré.

Fig. 13. — Une cellule de la corne antérieure de la moelle d'un singe; chromatolyse périphérique: désagrégation de la substance chromatophile; les contours du noyau ne sont pas parfaitement nets.

Fig. 14. — Une cellule de la corne antérieure de la moelle d'un singe; désagrégation complète de la substance chromatophile; les contours du noyau se distinguent difficilement.

Fig. 15. — Une cellule sinueuse de la corne antérieure de la moelle d'un singe.

Fig. 16. — Une cellule de la corne antérieure de la moelle d'un singe présentant la chromatolyse centrale.

Fig. 17. — Deux cellules presque homogènes des parties latérales de la corne antérieure de la moelle d'un singe; ces cellules portent de nombreux phagocytes.

Fig. 18. — Deux cellules du noyau du douzième nerf crânien d'un singe; désagrégation de la substance chromatophile; plusieurs phagocytes ont pénétré dans le protoplasma de ces cellules.

Fig. 19. — Une cellule du noyau du troisième nerf crânien d'un singe; désagrégation de la substance chromatophile; chromatolyse.

Tous ces dessins ont été exécutés au même grossissement du microscope Stiassnie : Obj. 7, ocul. 3.

BIBLIOGRAPHIE

1. E. Van Ermengem, Recherches sur les empoisonnements produits à Ellezelles (Hainaut), par du jambon. *Annales de la Soc. de Méd. de Gand*, 1899, Vol. LXXV. — Du même : Untersuchungen über Falle von Fleischvergiftung mit Symptomen von Botulismus (Vorlaufige Mittheilung). *Centralblatt für Bakteriologie*, etc., 1896, B. XIX, No, 12/13. — Du même : Contribution à l'étude des intoxications alimentaires. (Recherches sur les accidents à caractères botuliniques provoqués par du jambon.) *Archives de Pharmacodynamie*, 1897, Vol. III, Fasc. III-IV, pp. 213-350 et 499-601. — Du même : Ueber einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus. — *Zeitschrift für Hygiene*, 1897, B. XXVI, S. 1-56.

2. Ermengem, *L. c. Centralbl. f. Bacteriol.*, p. 442. *Zeitschrift fur Hyg.*, p. 32. *Arch. de Pharmacodynamie.*

3. Ermengem, *L. c. Arch. de Pharmacodynamie*, p. 250. *Zeitschrift fur Hyg.*, p. 11.

4. M. G. Marinesco, Lésions des centres nerveux produites par la toxine du bacillus botulinus. *Comptes rendus hebdomadaires des séances et mémoires de la Société de biologie*, 1896, Paris, T. III, p. 989-991. *Presse médicale*, 1887, No 8.

5. W. Kempner und B. Pollack, Die Wirkung des Botulismustoxins. (Fleischgiftes) und seines specifischen Antitoxins auf die Nervenzellen. *Deutsche medicinische Wochenschrift*, 1897, 23 Jahrgang, No 32.

6. L. Brieger und Boer, Ueber die Toxine der Diphterie und des Tetanus *Deutsche medicin. Woch.*, 1896, 22 Yahrgang, No 49.

L. Brieger und W. Kempner, Beitrag zur Lehre von der Fleischvergiftung. *Deutsch. medic. Woch.*, 1897, 23 Jahrgang, No 33.

7. W. Kempner und B. Pollack. *L. c.*

8. W. Kempner. Weitere Beitrag für Lehre von der Fleïschvergiftung. — *Zeitschrift für Hygiene*, 1897, B. XXVI, p. 481-500.

W. Kempner und E. Schepilewsky, Ueber antitoxische Substanzen gegenüber dem Botulismusgift. *Zeitschrift für Hygiene*, 1898. B. XXVII, p. 213-222.

9. E. Metchnikoff, Etudes sur la résorption des cellules. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1899, No 10.

CHARBON CHEZ LES ANIMAUX
NOURRIS AVEC LEURS ALIMENTS HABITUELS
MÊLÉS DE SPORES CHARBONNEUSES

PAR LE Dr NIKOLSKY

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.

Les travaux concernant l'alimentation des animaux par une nourriture contenant des spores du charbon sont très peu nombreux. En 1883 Koch[1], Gaffky et Lœffler avaient nourri des moutons avec les aliments contenant des spores charbonneuses. Ces savants ont démontré que ces spores ne périssent pas dans l'estomac; elles passent dans l'intestin où elles se développent en bâtonnets et d'où elles pénètrent dans les vaisseaux de la muqueuse.

G. Frank[2] avait nourri, avec des aliments contenant des spores charbonneuses, 62 rats dont 51 n'avaient jamais servi antérieurement à aucune expérience. Sur ces 51 rats, 26 périrent du charbon dès la première ingestion des organes d'un lapin mort du charbon; 4 furent sacrifiés dans le cours de la maladie; 4 moururent d'une entérite hémorragique; 1 rat mourut de la tuberculose pulmonaire un mois après; un rat a été sacrifié un mois après, et enfin 15 rats survécurent. A trois de ces 62 rats, Frank avait donné du pain arrosé avec le bouillon de culture du charbon. Ces rats ont survécu.

Sur les coupes des organes des animaux morts à la suite de ces expériences, Frank trouva des bacilles du charbon dans les parois des intestins en petite quantité. Ils étaient plus nombreux dans d'autres organes : le foie, la rate et le poumon, ils se trou-

1. KOCH, GAFFKY, LOEFFLER, Esperimentele Studien über die künstliche Abschwächung der Milzbrandbacillen und Milzbrandinfection durch Fütterung, *Mittheilung en. Kaiser. Ges. Amte*. B. II, page 147.

2. FRANK, Uber den Milzbrand bei Ratten und Kaninchen. *Separat-Abdruck aus Ergebnisse der Allgem. Pathol. und Pathologisch. Anatom. des Menschen und der Tier*

vaient, cependant, en moindre quantité dans les reins, et souvent ils étaient dans l'intérieur des cellules.

Il existe quelques travaux sur le passage des bacilles à travers les parois des intestins. Certains observateurs admettent la possibilité du passage du *coli-bacille commun* de l'intestin dans les tissus de l'organisme pendant la vie de l'animal. Beco [1] trouva que le passage des bactéries intestinales dans le sang et les organes se fait chez certains malades *avant* la mort.

D'après l'opinion de Makleson [2], les parois intestinales sont pénétrables pour les microbes lorsqu'elles sont le siège de l'hyperémie. Il trouva que, chez les lapins, l'arrêt des déjections pendant 22 heures était suffisant pour voir passer les bactéries à travers les parois des intestins. Dans le nº 36 du *Berliner klin. Wochensch.* de cette année a paru un article du professeur C. Posner et du Dr J. Cohn sur la perméabilité des parois intestinales pour les bactéries. Dans cet article, Posner cite ses travaux précédents sur le même sujet, qu'il avait faits en collaboration avec Lewin en 1894, 1895-96; il mentionne aussi ceux entrepris par Beco, Scharpe, Makleson, Austerlitz et Landsteiner. Il relate ses expériences sur l'occlusion de l'anus chez les lapins pendant 24-48 heures. Il trouvait dans le sang et les différents organes les coli-bacilles, et les autres micro-organismes qu'on avait injectés dans le rectum.

Markus [3], au contraire, nie la pénétration des bacilles à travers les parois des intestins. Il faisait aussi comme Posner l'occlusion de l'anus, seulement il tuait ses animaux trop tôt, avant 24 heures, et quelquefois pendant les 2 premières heures. Cela explique pourquoi il n'a pu observer le passage des bacilles à travers les parois intestinales.

Neisser [4] et Opitz [5], qui nourrissaient leurs animaux d'une façon normale sans aucun mélange, ne purent constater non plus le passage des bactéries à travers les parois intestinales.

En partant du raisonnement que le bétail s'infecte du charbon en absorbant les bactéries charbonneuses avec la nourriture, et que, par conséquent, l'infection se produit par les voies digestives, je nourrissais mes animaux avec leur nourriture habituelle,

1. Pénétration des microbes intestinaux. *Annal. Past.* I, IX, 199.

2. Zur Frage der Durchgangigkeit der Darmwand bei Darmverchluss, d'après le résumé du *Centralbl. f. Bakter.*, B. XXI, page 939.

3. 4. 5. Cités par Posner et Cohn (*loco cit.*).

ayant cependant soin d'y ajouter des microbes charbonneux. Voici le résumé de mes expériences : J'ai commencé par donner à 5 rats blancs adultes, du pain blanc arrosé avec une émulsion d'une culture de spores charbonneuses sur gélose sans peptone, faite dans l'étuve à 37°. Ces rats restèrent assez longtemps indemnes : 2 moururent au bout de 16 jours (c'est-à-dire à la suite de 16 repas infectés); un rat mourut au bout de 17 jours et 2 rats au bout de 21 jours. L'autopsie de ces animaux démontra qu'ils périrent tous du charbon. Dans tous ces cas, le foie et la rate étaient augmentés de volume, les reins gonflés, sur la plèvre et sur la surface du foie il y avait des ecchymoses. L'examen microscopique dévoila la présence des bacilles charbonneux dans le sang du cœur : ils étaient soit isolés soit disposés en chapelet. L'intestin grêle était hypérémié à la suite de la stase sanguine. Dans les cultures du sang du cœur sur gélose à l'étuve, les colonies du charbon se développaient au bout de 27 heures. J'ai trouvé également un grand nombre de bactéries charbonneuses sur les coupes de l'intestin et d'autres organes internes, durcis dans le sublimé.

Après les rats blancs j'ai continué mes expériences sur sept jeunes rats gris. Je les ai aussi nourris avec du pain arrosé de cultures charbonneuses. Ces 7 rats ont supporté cette nourriture pendant 1 mois 3 jours, et aucun n'en est mort. Ces expériences n'aboutissant pas à la mort des animaux, j'ai résolu de les faire sur des lapins.

Le premier lapin auquel j'ai donné du pain mélangé à l'herbe finement hachée et infectée de spores charbonneuses mourut au bout de 2 jours, c'est-à-dire à la suite de 2 ingestions de la nourriture infectée. Les examens macroscopique et microscopique, ainsi que les cultures sur gélose du sang du cœur, constatèrent qu'il était mort du charbon.

Ensuite, j'ai continué à faire mes expériences sur 6 lapins que je nourrissais de la même façon que le premier, c'est-à-dire avec du pain et de l'herbe arrosés de l'émulsion de la culture sur gélose. Je les sacrifiais pour saisir le moment où commence le passage des microbes à travers les parois de l'intestin, avant leur entrée dans le courant sanguin. J'ai sacrifié le premier de ces 6 lapins 24 heures après l'absorption de la nourriture

infectée. Mais l'examen microscopique n'a pas constaté la présence des bacilles dans le sang du cœur; l'ensemencement de ce sang sur gélose à l'étuve n'a pas donné non plus de cultures de charbon.

Le second lapin a été sacrifié deux jours après l'absorption de la nourriture infectée. Ici encore le résultat fut négatif.

Le troisième mourut au bout de 2 jours. L'examen microscopique et les cultures démontrèrent qu'il avait succombé au charbon.

Le quatrième lapin a été sacrifié 3 jours après l'absorption de la nourriture infectée. Le sang du cœur de ce lapin renfermait des bacilles du charbon, et j'ai obtenu avec ce sang des cultures de charbon sur gélose.

Le quatrième jour il y avait deux lapins vivants. L'un d'eux succombe au charbon le cinquième jour, ce qui a été confirmé par l'autopsie, l'examen microscopique et les cultures.

Ce jour même, j'ai sacrifié le sixième lapin qui a été infecté de charbon, ainsi que le démontrèrent les préparations microscopiques et les cultures du sang du cœur sur gélose. Les coupes des organes de tous ces animaux ont été, après l'autopsie, durcies par le sublimé et fixées ensuite dans la paraffine. La coloration a été faite d'après la méthode de Gram. A l'examen des coupes du lapin sacrifié au bout de 24 heures, j'ai trouvé à la surface de la muqueuse de l'intestin grêle différents microbes (bâtonnets et cocci). La plupart des bâtonnets étaient certainement, d'après leur aspect et leurs dispositions, les bactéries du charbon.

Quelques-uns de ces bâtonnets se trouvaient dans les espaces intercellulaires de la couche superficielle de l'épithélium. Les capillaires de la muqueuse étaient gorgés de sang. Les microorganismes de cette couche superficielle de la muqueuse étaient disposés soit isolément, — ce qui se rencontrait le plus fréquemment, — soit par groupes. Chez le lapin sacrifié au bout de 48 heures, on voyait aussi sur les coupes de l'intestin grêle les bacilles charbonneux disséminés sur la surface de la muqueuse; quelques-uns seulement avaient pénétré soit dans les espaces intercellulaires de l'épithélium, soit dans l'embouchure des glandes de Lieberkuhn. Au bout de 48 heures, on trouvait les bactéries charbonneuses aussi dans le tissu folliculaire des glandes du mésentère et dans la pulpe de la rate.

Sur les coupes des organes des lapins morts ou sacrifiés au bout de 3 jours, j'ai trouvé un grand nombre de bacilles charbonneux dans toutes les couches de l'intestin grêle (couche muqueuse, sous-muqueuse, et couche musculaire externe); quelquefois ils étaient disposés en chapelet et paraissaient se trouver dans les vaisseaux lymphatiques. Dans d'autres organes ils étaient aussi très nombreux, surtout dans les poumons (dans les parois des alvéoles et dans leurs capillaires) et les reins (dans les capillaires des glomérules). Dans le foie ils étaient en petite quantité (dans les capillaires des lobules), ainsi que dans la rate.

Ce même tableau se rencontrait chez le lapin sacrifié le cinquième jour.

J'ai fait aussi des cultures sur gélose avec les ganglions mésentériques, les ganglions lymphatiques et le contenu du canal thoracique et de la veine porte, pris sur les lapins sacrifiés au bout de 2, 4 et 6 jours. Je gardais habituellement ces cultures à l'étuve dans les boîtes de Petri pendant 24 heures, et j'obtenais toujours des colonies charbonneuses; elles étaient surtout nombreuses dans les cultures faites avec les ganglions mésentériques.

Après cette série de 6 lapins, j'ai renouvelé mes expériences sur une autre et je sacrifiai tous les lapins de cette dernière série sans attendre leur mort naturelle.

J'ai sacrifié le premier lapin 7 heures après qu'il avait mangé de la nourriture infectée; le second, 18 heures après; le troisième au bout de 3 jours; le cinquième au bout de 4 jours. N'ayant pas trouvé chez les cinq lapins des bacilles charbonneux dans le sang du cœur (ni dans les préparations, ni dans les cultures), j'ai conservé le sixième lapin pendant 9 jours, et je l'ai sacrifié seulement le dixième jour. Mais lui non plus n'a pas eu de bacilles charbonneux dans le sang du cœur. L'examen des coupes des autres organes donna des résultats négatifs.

Avant d'entreprendre les expériences sur cette seconde série des lapins, je me suis préalablement assuré quelle était la force de la virulence de la culture dont j'allais me servir dans ces recherches. Après quelques essais je suis arrivé à la conclusion que 1 c. c. d'émulsion de la culture sur gélose (l'émulsion a été

préparée avec 5 c. c. de solution physiologique du sel marin), injectée sous la peau, tuait un lapin dans 36 heures.

Ainsi que j'ai dit plus haut, l'agent charbonneux paraissait sous ses formes végétales déjà sur la surface interne des intestins. Cependant c'était des *spores* qu'on avait mélangées aux aliments qu'on donnait aux animaux. Évidemment c'est dans l'intestin même que ces spores subissaient leur transformation en bacilles.

Après avoir obtenu des résultats satisfaisants dans mes expériences sur les lapins, j'ai voulu revenir aux rats avec une culture plus virulente.

J'ai déjà dit que j'avais nourri 7 rats gris, pendant 1 mois et 3 jours, avec des aliments infectés par les spores du charbon. J'ai recommencé ces expériences. En outre je soumettais au même régime 3 nouveaux rats blancs, 4 souris blanches et 4 cobayes. Des 7 rats gris, 1 est mort après avoir mangé une fois de la nourriture infectée, 1 après en avoir mangé trois fois, 4 après l'avoir mangée dix fois. Et enfin 1 rat l'avait mangée pendant vingt-sept jours, n'en est pas mort, et vit encore jusqu'à présent.

Sur la seconde série de rats blancs, 2 sont morts du charbon au bout de 6 jours et un au bout de 21 jours.

Des 4 souris blanches, une est morte au bout de 2 jours, une autre au bout de 11 jours ; la troisième au bout de 21 jours ; et enfin la quatrième au bout de 2 mois et 4 jours.

Des 4 cobayes, un est mort après deux repas infectés, un autre au bout de 3 jours, le troisième au bout de 11 jours et le quatrième au bout de 12 jours.

Dans toutes ces expériences la présence du charbon a été constatée par les préparations microscopiques et les cultures faites avec du sang du cœur. Je n'ai fait des coupes que sur les organes des lapins.

Simultanément j'ai nourri 3 rats gris avec les organes de cobayes succombés au charbon, et 5 rats avec du pain arrosé avec du bouillon de la culture contenant les formes végétatives du charbon. Je l'ai fait dans le but de connaître l'effet de ces formes sur l'organisme animal.

Trois rats moururent du charbon après avoir mangé deux

fois des organes des cobayes charbonneux. Le quatrième est mort après avoir absorbé aussi deux fois ce charbon sous ses formes végétatives. Le cinquième est mort au bout de 3 jours, le sixième au bout de 6 jours et le septième et le huitième sont restés vivants.

Enfin j'ai répété les expériences sur une nouvelle série de 6 lapins auxquels je donnais la nourriture infectée de spores charbonneuses. Je les sacrifiais au bout du même espace de temps, comme je l'avais fait avec la deuxième série, sans attendre leur mort naturelle. J'ai rencontré des bacilles charbonneux dans le sang du cœur seulement chez le troisième lapin de cette troisième série. Il y en avait, chez lui aussi, dans tous les autres organes, et ils étaient disposés de la même façon que dans la série précédente. Chez les autres lapins de cette série, j'ai trouvé des bacilles charbonneux seulement sur la paroi des intestins et principalement dans la couche superficielle de l'épithélium, rarement dans les autres couchés.

Des 19 lapins sur lesquels j'ai fait mes expériences, 3 seulement moururent spontanément; tous les autres furent tués. Par conséquent il a été impossible d'établir quelle est la mortalité par le charbon chez les lapins nourris avec les aliments infectés de spores charbonneuses. C'est pourquoi j'ai renouvelé les expériences sur une série de 10 lapins. J'ai renforcé la culture en la faisant passer par un lapin. Avec la culture des spores obtenue de ce dernier, j'arrosais le pain et l'herbe que je donnais à ces 10 lapins. De ce nombre, un mourut de la coccidiose au bout de 2 jours, 3 du charbon au bout de 4 jours, un du charbon au bout de 5 jours, 2 du charbon au bout de 6 jours, un d'une maladie accidentelle au bout de 8 jours, et deux sont restés vivants après avoir mangé de la nourriture infectée pendant 10 jours. Ainsi, sur 10 lapins, 6 sont morts du charbon.

De toutes ces expériences il résulte :

1° Que chez les animaux nourris avec des aliments infectés par les spores charbonneuses, le charbon se développe aussi bien que par infection par toute autre voie;

2° Que les spores se développent dans le contenu des intestins malgré l'antagonisme des microbes intestinaux, et pénètrent

progressivement de la muqueuse dans les vaisseaux lymphatiques et de là dans le sang.

En terminant ces recherches, je remercie M. Metchnikoff, qui a bien voulu m'indiquer ce sujet de travail et m'a autorisé à l'exécuter dans son laboratoire.

ÉTUDES SUR LA PHAGOCYTOSE

DANS UNE INFECTION MORTELLE

PAR LE Dr TH. TCHISTOVITCH, DE SAINT-PÉTERSBOURG.

(Travail du laboratoire de bactériologie de l'Académie de médecine de Saint-Pétersbourg.)

Ce travail a pour but l'étude des phénomènes de la phagocytose dans les organes durant le cours des infections mortelles produites par l'injection des microbes dans le système sanguin.

Après que M. Metchnikoff et son École eurent créé la théorie de l'immunité contre les microbes, et reconnu pour principal facteur de cette immunité l'activité phagocytaire des cellules du mésenchyme, la question se posa naturellement de savoir jusqu'à quel point les leucocytes et autres cellules phagocytaires possèdent la faculté du libre choix entre les divers microbes avec lesquels elles entrent en contact, ou, autrement dit, dans le cas où deux microbes différents se trouveraient dans la sphère de l'action phagocytaire, quelle est la raison qui pousserait le phagocyte à englober l'un et à dédaigner l'autre.

MM. Massart et Bordet ont donné à ce fait une explication parfaitement satisfaisante.

Ils ont prouvé que les phagocytes, comme les plantes inférieures, sont doués d'une certaine sensibilité vis-à-vis des substances chimiques, qu'ils sont attirés par les unes et repoussés par d'autres. La chimiotaxie est le principal agent de l'immunité : c'est elle qui pousse les phagocytes à englober et à digérer certains microbes et à en dédaigner d'autres.

La théorie de la chimiotaxie positive et négative a été confirmée par les travaux d'un grand nombre d'expérimentateurs, et s'est acquis une autorité assurée dans la science.

Cette théorie s'applique surtout aux cas où, en habituant graduellement l'organisme à une certaine espèce de microbes pathogènes, on réussit à modifier les propriétés des cellules

phagocytaires à tel point qu'elles digèrent même les cultures virulentes, tandis que l'organisme acquiert en même temps l'immunité contre cette espèce de microbes.

Cette théorie dut subir cependant maintes épreuves. On avait souvent observé que, dans le cours des infections mortelles des lapins produites par le virus du rouget des porcs, les bactéries se trouvaient tout de même englobées par les leucocytes. Ce fait est également constaté pour la tuberculose, la gonorrhée, la lèpre et quelques autres infections.

C'est sur ces faits que s'appuyèrent les adversaires de la théorie phagocytaire pour nier la chimiotaxie comme base de l'immunité : les phagocytes englobant des microbes qui, loin d'être digérés, se multiplient à l'intérieur des cellules et amènent quelquefois la mort de l'animal, il ne peut plus être question de chimiotaxie positive comme condition nécessaire de l'immunité.

Cette opinion ne mérite certes pas d'être sérieusement réfutée. Il suffit de dire que les infections accompagnées de phagocytose, toutes mortelles qu'elles soient, sont toujours moins rapides que celles où la reproduction des microbes ne trouve pas d'obstacle.

A ce point de vue, toute phagocytose qui localise l'infection généralisée dans le sang (quelque nombreux que soient d'ailleurs les foyers de localisation) doit être mise au rang des manifestations d'un mécanisme défensif.

Les injections mortelles accompagnées de phagocytose ne nuisent donc en rien à la portée biologique de cette théorie qui reconnait la double chimiotaxie (positive et négative) des leucocytes comme base de l'immunité. La chimiotaxie est considérée avec raison comme un mécanisme remplaçant les organes des sens pour les organismes monocellulaires, et c'est elle qui les guide dans le choix des différentes substances circulant dans le liquide ambiant.

Tels étaient les faits généralement reconnus, lorsque M. Wérigo, par ses expériences sur la bactéridie du charbon [1] et ensuite sur le choléra des poules [2] très virulent, constata que ces deux infections sont toujours accompagnées de phagocytose, quelque rapide qu'en soit le cours, et si grande que

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1895.
2. *Archives russes de pathologie*, 1898.

soit la virulence du microbe. M. Wérigo, injectant dans les veines des lapins une grande quantité de ces microbes, et étudiant le cours des infections sur les coupes des organes, constata toujours les phénomènes de la phagocytose dans le foie, la rate et le poumon, jusqu'à la dernière période de la maladie, alors que les microbes se multipliaient sans obstacle et que toute réaction de l'économie cessait de se manifester. C'est ce qui conduisit M. Wérigo à conclure que la chimiotaxie négative n'existe pas : les microbes sont toujours englobés, quelle qu'en soit la virulence, et l'issue de l'infection ne dépend que d'une chose, à savoir si les phagocytes peuvent digérer leur proie, ou s'ils périssent dans la lutte contre les microbes englobés.

C'est ce doute sur l'existence même de la chimiotaxie négative qui m'a poussé à entreprendre des expériences de contrôle.

Afin de faciliter la recherche des microbes dans les organes, j'ai choisi le streptocoque d'une grande virulence que M[me] Sieber a eu l'obligeance de mettre à ma disposition (cette espèce est employée à l'Institut de médecine expérimentale pour la préparation du sérum antistreptococcique). C'est un streptocoque court, qui trouble le bouillon. Pour en conserver la virulence, on le cultive sur le milieu de Marmorek, où il pousse jusqu'à dix jours sans rien perdre de sa virulence. Pour les injections intraveineuses des lapins, je me suis servi de 3 1/2, 4 c. c. au plus d'une jeune culture (24-48 heures) sur milieu de Marmorek. Il m'a semblé très important d'employer pour l'injection aussi peu de culture que possible, afin de ne pas introduire dans l'économie, de prime abord, des quantités énormes de microbes et de leurs produits. Ce procédé rend plus difficile la recherche des microbes dans les tissus, mais il permet en revanche de saisir les rapports respectifs naturels des microbes et des cellules animales. De plus, il est préférable de choisir un microbe prenant le Gram, pour en faciliter la recherche dans les coupes. Les microbes qui ne se colorent pas par cette méthode (comme le choléra des poules par exemple), lorsqu'ils se trouvent dans les tissus en petite quantité, simulent si bien les granulations des cellules qu'il devient à peu près impossible de les discerner. Le bacille pyocyanique même, dont j'ai cru pou-

voir me servir tout d'abord. a dû être abandonné, vu son peu de résistance: au bout d'un temps très court ces bactéries ne se coloraient plus du tout.

J'injectais donc 3, 3 1/2 c. c. d'une jeune culture (sans toxines, si possible) de streptocoque sur milieu de Marmorek (je me suis servi de bouillon et de liquide aseptique en parties égales) dans la veine auriculaire de plusieurs lapins, dont l'un servait de témoin. Ensuite les animaux étaient tués à intervalles différents par un coup sur la nuque, et l'on procédait rapidement à l'autopsie, en ayant soin de mettre une ligature au lobe du poumon qu'on voulait ensuite étudier au microscope pour lui conserver tout son sang.

Des morceaux d'organes, tels que poumon, rate, foie, rein et moelle (cuisse) étaient plongés aussitôt dans une solution saturée de sublimé ou dans de l'alcool absolu. Après les manipulations d'usage et l'inclusion dans la paraffine, les coupes (5 μ d'épaisseur) étaient colorées par une solution alcoolique de carmin ou par la méthode de Weigert. L'examen des frottis, que je pratiquais au début, donnait presque toujours des résultats négatifs, vu qu'on injectait en général très peu de microbes; c'est pourquoi j'ai bientôt abandonné cette méthode.

A l'examen microscopique, j'ai étudié les rapports des cellules avec les microbes, et le nombre approximatif de ceux-ci.

Dix lapins ont été sacrifiés à divers intervalles après l'injection de streptocoques : 1/4, 1/2, 3/4, 1 heure, 1 h. 1/2, 2 heures, 4 heures, et 6 heures.

N° 1. — Un lapin, pesant 1,450 grammes, reçoit, le 5/XI, dans la veine auriculaire, 3 1/2 c. c. d'une culture de 24 heures de *streptococcus brevis* sur milieu de Marmorek. Le témoin succombe en 50 heures. Le lapin n° 1 est tué un 1/4 d'heure après l'injection.

Voici ce que nous donne l'examen des coupes :

Le poumon contient des streptocoques en quantité assez considérable; ils sont libres pour la plupart, mais il y en a aussi d'englobés par les microphages. *Le foie* contient des streptocoques en grande quantité, pour la plupart libres ou dans les cellules de Kupfer; rarement on en trouve qui sont englobés par des leucocytes (polynucléaires); quelquefois on voit des leucocytes groupés autour des tas de streptocoques.

Les coccus prennent partout une coloration intense et se décolorent difficilement. *La rate* ne contient pas beaucoup de streptocoques, ils sont tous libres et disséminés dans la pulpe, entre les cellules; les follicules sont exempts de microbes, fait constaté dans toutes mes expériences. Dans la

couche périphérique de la *moelle* on trouve assez souvent des coccus isolés et libres.

N° 2. — Deux lapins A et B reçoivent, le 1/XI, à trois heures de l'après-midi : A (1,000 gr.) — 4 c. c., et B (1130,0 gr.) — 3 1/2 c. c. d'une culture de 48 heures de streptocoque. B succombe en 52 heures, A est tué une demi-heure après l'injection.

Poumon. Peu de streptocoques, tous libres, je n'en ai vu d'englobés que deux fois.

Foie. Pas beaucoup de streptocoques, le plus grand nombre se trouvent dans les cellules de Kupfer, les autres sont libres. Pas de phagocytose leucocytaire. Les microbes renfermés dans les cellules de Kupfer présentent quelquefois des contours inégaux, comme rongés ; la coloration par la méthode de Weigert est faible, inégale ; les microbes se décolorent facilement.

Rate. Assez de streptocoques, tous libres, il y en a qui sont rongés comme ceux qui sont englobés par les cellules de Kupfer.

Moelle. Peu de streptocoques, tous libres.

Rein. Pas de streptocoques.

N° 3. Un lapin pesant 1,180 grammes reçoit, le 24/III, 3 c. c. d'une culture de 24 heures. On le tue une demi-heure après. Le témoin (1,250 grammes) reçoit la même dose et meurt en 22 heures.

Poumon. Pas beaucoup de streptocoques. La plupart sont englobés par les microphages, les streptocoques libres sont moins nombreux ; peu de polynucléaires en général. Ils sont souvent groupés autour des tas ou des chaînes isolées de streptocoques.

Foie. Assez de streptocoques, pour la plupart libres et renfermés dans les cellules de Kupfer. Assez de polynucléaires, mais pas de phagocytose de ce côté.

Rate. Assez de streptocoques, tous libres, pas de phagocytose.

Moelle. On trouve assez souvent des streptocoques dans la couche périphérique. Tous libres.

N° 4. Un lapin, pesant 1,100 grammes, reçoit 4 1/2 c. c. d'une culture de 3 jours (72 heures). Tué trois quarts d'heure après. Le témoin (1,100 grammes) reçoit 3 1/2 c. c. et meurt en 23 heures.

Poumon. Presque pas de streptocoques. Le peu de microbes qu'on trouve sont pour la plupart des cas englobés pour les micro et macrophages.

Foie. Beaucoup de streptocoques, pour la plupart à l'intérieur des cellules de Kupfer (chaînes longues) ; les streptocoques libres sont moins nombreux. Presque pas de leucocytes renfermant des microbes.

Rate. Les streptocoques en très grande quantité, pour la plupart libres, quelquefois englobés par les microphages.

Moelle. Très peu de microbes, tous libres.

Rein. Pas de streptocoques.

N° 5. Un lapin pesant 1,050 grammes reçoit, le 24/III, dans la veine de l'oreille, 3 c. c. 3 d'une culture de 24 heures. Tué 1 heure après. Le témoin meurt en 22 heures.

Poumon. Des streptocoques en assez grande quantité, tant libres qu'englobés par les microphages, partout dans les vaisseaux capillaires, beaucoup de leucocytes polynucléaires.

Foie. Beaucoup de streptocoques libres et englobés par les cellules de Kupfer; on trouve parfois des microphages isolés contenant des streptocoques. Beaucoup de polynucléaires dans les capillaires.

Rate. Pas beaucoup de streptocoques, tous libres.

Moelle. Presque pas de streptocoques.

Rein. Quelques coccus dans les vaisseaux des glomérules.

N° 6. Un lapin pesant 1,100 grammes reçoit, le 24/III, 3 c. c. d'une culture de 24 heures, injectée dans la veine auriculaire. Tué 1 h. 1/2 après l'injection. Le témoin succombe en 22 heures.

Poumon. Beaucoup de streptocoques, tant libres qu'englobés par les microphages; en général, beaucoup de polynucléaires.

Foie. Les streptocoques en très grande quantité, libres et englobés par les cellules de Kupfer, qui en sont complètement farcies. Beaucoup de leucocytes polynucléaires ; quelquefois ils sont en contact immédiat avec les streptocoques ; cependant la phagocytose fait complètement défaut.

Rate. Des streptocoques en très grande quantité, tous libres.

Moelle. Assez de streptocoques libres.

Rein. Pas de streptocoques.

N° 7. Un lapin pesant 1,345 grammes, reçoit, le 29/XI, 4 c. c. d'une culture de 48 heures dans la veine de l'oreille. Tué deux heures après. Le témoin (1,470 grammes) reçoit 3 c. c. 3 et meurt le 1/XII, c'est-à-dire en 30 heures.

Poumon. A peine quelques streptocoques libres.

Foie. Peu de streptocoques, ils sont en partie libres et en partie englobés par les cellules de Kupfer. Dans ces dernières on voit beaucoup de microbes à moitié décolorés et rongés.

Dans les capillaires beaucoup de polynucléaires; ils sont groupés quelquefois autour des cellules de Kupfer, mais la phagocytose fait défaut.

Rate. Très peu de streptocoques, tous libres.

Moelle. Très peu de streptocoques, tous libres.

Le rein n'a pas été examiné.

N° 8. Un lapin, pesant 1,030 grammes, reçoit 3 c. c. d'une culture de 3 jours. Tué 2 heures après. Le témoin pesant 1,000 grammes succombe en 42 heures.

Poumon. De rares exemplaires isolés, libres, quelquefois dans les *Staubzellen.* Pas de microphages renfermant des streptocoques.

Foie. Assez de streptocoques libres et englobés par les cellules de Kupfer.

On voit dans celle-ci des coccus dégénérés à côté d'autres qui se colorent bien. Très peu de microphages renfermant des streptocoques.

Rate. Des streptocoques en très grande quantité, tant isolés que formant des groupes (foyers de reproduction ?). Quelquefois les streptocoques semblent se trouver à l'intérieur des cellules endothéliales. Les polynucléaires ne renferment pas du tout de microbes.

Moelle. Très peu de streptocoques, tous libres.

Rein. Pas de microbes.

N° 9. Un lapin, pesant 1,070 grammes, reçoit la même dose que 8. Tué 4 heures après. Le témoin succombe en 42 heures.

Poumon. Les exemplaires isolés qu'on trouve sont tous libres; en général, très peu de microbes.

Foie. Beaucoup de streptocoques, pour la plupart englobés par les cellules de Kupfer; il y en a aussi de libres. Les polynucléaires, bien que très nombreux dans les capillaires, ne manifestent aucune trace de phagocytose.

Rate. Des streptocoques en très grande quantité, tous libres.

Moelle. A peine quelques exemplaires isolés.

Rein. Des exemplaires isolés dans les vaisseaux des glomérules et entre les tubes urinifères.

N° 10. Même injection. Tué 6 heures après; le témoin succombe en 42 heures.

Poumons. Très peu de streptocoques, pour la plupart libres; très rarement dans les *Staubzellen*.

Foie. Pas beaucoup de streptocoques, libres et dans les cellules de Kupfer, en partie dégénérés; pas de phagocytose par les polynucléaires, bien qu'il y ait beaucoup de microphages; quelquefois on trouve les polynucléaires réunis en groupes autour des streptocoques.

Rate. Des streptocoques en très grande quantité, tous libres.

Moelle. Des exemplaires isolés, toujours libres.

Rein. A peine quelques exemplaires dans les glomérules.

Je n'ai pas fait d'expériences de plus longue durée parce que les microbes, se multipliant rapidement, envahissent tous les organes, et que les cellules deviennent absolument passives.

Ces expériences nous ont montré qu'immédiatement après l'injection intraveineuse de streptocoques, on en trouve en quantité considérable dans le poumon, libres d'abord, ensuite englobés par des leucocytes polynucléaires. Les leucocytes sont très nombreux, ils envahissent les capillaires et s'entassent dans les endroits où les microbes pénètrent. La phagocytose observée dans le poumon est loin d'être complète, et chez tous les lapins, à côté des streptocoques englobés, on en trouve de libres; ils sont plus ou moins nombreux, surtout dans les premiers et dans les der-

niers moments de la maladie : quant à la phagocytose, on la constate aux premiers stades de l'infection, et surtout 2—3 heures après l'injection.

Le foie offrait un tableau moins varié et plus clair : un grand nombre de streptocoques se trouvaient dans les cellules de Kupfer; tout d'abord ils se coloraient facilement; plus tard il y en avait qui ne prenaient plus le Gram. Un plus petit nombre de streptocoques se trouvaient libres dans les capillaires des lobules. La phagocytose n'a jamais été constatée : des microphages isolés ayant englobé des microbes n'ont été signalés que pour les nos 1, 4 et 5, bien que les polynucléaires fussent toujours très nombreux dans les capillaires et même autour des cellules de Kupfer, farcies de microbes. Cette circonstance mérite surtout d'attirer notre attention à cause de la différence avec les phénomènes constatés dans le poumon.

Les éléments de la rate se sont toujours montrés passifs vis-à-vis des microbes, bien que ceux-ci s'y soient fixés en quantité assez considérable : la phagocytose par les polynucléaires n'a jamais pu être constatée; les streptocoques s'y trouvent quelquefois englobés par les cellules mononucléaires (endothéliales?); plus souvent ils sont libres.

Signalons encore un fait constaté pour le poumon ainsi que pour le foie : la quantité totale des microbes diminue vers la deuxième, la troisième heure après l'infection. Ce minimum se produit partout en même temps, et fait ensuite place à une nouvelle augmentation du nombre des microbes.

La moelle ne joue, à ce qu'il paraît, aucun rôle actif dans le cours de l'infection ; les streptocoques s'y rencontrent rarement, se tiennent préférablement dans les couches périphériques de la moelle, et ne sont jamais englobés par les éléments figurés de cet organe, bien qu'il soit très riche en phagocytes de toute espèce.

Le rôle du rein est encore moindre. Les microbes ne s'y rencontrent que dans les capillaires des glomérules et seulement à la dernière période de la maladie, lorsque tous les organes sont envahis par les streptocoques qui se sont multipliés dans le sang. Quant au parenchyme du rein, il reste toujours relativement exempt de microbes.

Cette observation se trouve en contradiction avec les résul-

tats annoncés par M. Pavlovsky, qui affirme avoir trouvé une élimination abondante de microbes par le rein [1]. Il est à signaler cependant que dans ses expériences, basées sur la numération des colonies obtenues par l'ensemencement de l'urine et du rein, le tissu du rein s'est trouvé plus d'une fois stérile, pendant que l'urine contenait des microbes.

Tels sont les faits; il me reste quelques mots à dire pour expliquer les tableaux décrits.

La phagocytose des polynucléaires manque en général, sauf dans le poumon.

Évidemment cet organe offre des conditions facilitant le processus de la phagocytose, et ces conditions sont probablement de deux espèces.

1° En injectant une culture, nous sommes bien loin d'introduire dans le sang des éléments homogènes : à côté des coccus d'une grande virulence, il y en a d'autres qui sont dégénérés, affaiblis, morts même. Si ce mélange de microbes d'une virulence si différente eût été injecté sous la peau ou dans une cavité ne contenant au moment donné que peu de leucocytes, la phagocytose n'aurait pu se manifester, car de nouveaux leucocytes ne seraient attirés ni par les microbes virulents ni par les microbes affaiblis, perdus pour ainsi dire dans des produits d'une culture virulente. Mais nous introduisons ce mélange dans le sang, en le délayant dans une quantité énorme de liquide où chaque streptocoque est abandonné à ses propres forces. Il est évident que les leucocytes ne doivent pas se montrer aussi passifs vis-à-vis d'un petit nombre de microbes affaiblis, que vis-à-vis de la généralité des streptocoques virulents, et voici pourquoi le poumon — où les microbes sont apportés tout d'abord — offre à l'examen microscopique une certaine quantité de microbes englobés.

2° Il y a une autre circonstance qui corrobore l'englobement des microbes dans le poumon. Aussitôt après l'injection des cultures virulentes dans le sang, on observe une hypoleucocytose bien marquée. Elle dépend de ce que les leucocytes, les polynucléaires surtout, s'arrêtent dans les capillaires du poumon. Ces thrombus leucocytaires retiennent peut-être les

1. De l'infection et de l'immunité. *Journal de Médecine militaire*, 1899, mai, en russe.

microbes circulant dans le sang, et c'est ce contact immédiat qui facilite peut-être l'englobement des streptocoques.

Cette explication nous paraît conforme à la vérité, surtout si l'on compare les tableaux microscopiques du poumon avec ceux du foie.

Les cellules de Kupfer, spécialement appropriées, à l'instar de filtres, à englober les parcelles circulant dans le sang (telles que granulations graisseuses, encre de Chine, débris des hématies, pigments, microbes) se remplissent rapidement de streptocoques.

Une fois englobés par les cellules de Kupfer, les streptocoques deviennent inaccessibles aux phagocytes du sang. Le peu de microbes échappés aux cellules de Kupfer restent dans le plasma sanguin à côté des polynucléaires, mais ils ne sont pas englobés par ceux-ci : la phagocytose active fait complètement défaut, bien qu'elle ne rencontre d'autre obstacle que la chimiotaxie négative des leucocytes vis-à-vis des microbes.

Grâce à la largeur des capillaires du foie, ils n'offrent aucun obstacle à la circulation du sang, et tandis que dans le poumon les éléments figurés s'arrêtent en grande quantité et contribuent à l'inonder de leucocytes, — dans le foie, ils passent librement des capillaires aux veines.

Je n'ai pas pris sur moi de tirer au clair le sort des streptocoques englobés par les cellules de Kupfer; une partie de ces microbes périssent probablement (ils sont digérés par les cellules), d'autres se multiplient et se remettent à circuler dans le sang.

La même chimiotaxie négative des leucocytes vis-à-vis des microbes a été constatée dans la rate, la moelle et le rein.

Or, une phagocytose quelque peu considérable, et qui pût jouer un rôle dans le cours de la maladie (j'entends une phagocytose par les éléments mono et polynucléaires du sang), a fait complètement défaut pendant l'infection mortelle que nous avons produite. Ce résultat négatif ne porte pas un caractère absolu, car il est impossible d'avoir des cultures absolument virulentes et homogènes; il existe évidemment une série d'états de transition, depuis la phagocytose dans le cours des infections non mortelles jusqu'à la mort passive et rapide, occasionnée par les cultures d'une haute virulence. Il nous semble pourtant que

les expériences citées suffisent pour nous convaincre que la mort de nos lapins est due à l'insuffisance de l'activité phagocytaire des leucocytes polynucléaires, qui manifestaient toujours une chimiotaxie négative vis-à-vis des microbes.

Les résultats opposés, obtenus par M. Wérigo, s'expliquent peut-être par ce fait qu'il introduisait des quantités énormes de microbes et de toxines, jusqu'à 15 c. c. à la fois. Parmi les microbes pris en si grande quantité, il s'en trouve sûrement assez qui sont affaiblis (par rapport à la chimiotaxie négative), surtout quand il s'agit d'un microorganisme aussi peu résistant que celui du choléra des poules. Cette explication se trouve confirmée par ce fait que M. Wérigo ne trouvait pas de phagocytose à la dernière période de la maladie, alors que le sang abonde en jeunes microbes d'une haute virulence, et habitués déjà à la vie parasitaire dans l'organisme du lapin.

LA PHAGOCYTOSE DANS LA DYSENTERIE

PAR M. CH. DOPTER

Médecin aide-major de 1re classe.

L'examen microscopique des selles dysentériques révèle habituellement l'existence d'éléments divers : ce sont des cellules cylindriques accolées les unes aux autres, ou isolées, derniers vestiges de la muqueuse intestinale desquamée : des globules rouges, des leucocytes, polynucléaires pour la plupart, et des bactéries très nombreuses, de différentes espèces. Le microbe le plus abondant, du moins au début, est, d'après ses caractères et ceux de ses cultures, le bactérium coli : dans un grand nombre de cas, il existe seul à l'exclusion de tout autre.

Suivant que l'affection est bénigne ou grave, les selles, examinées systématiquement aux différentes phases de la maladie, donnent lieu aux constatations suivantes :

Dans une dysenterie bénigne, à son début, parmi les nombreux colibacilles que contiennent les déjections, les uns sont libres dans le liquide intestinal, mais la plupart sont inclus dans les leucocytes qui les ont englobés. Cette phagocytose s'effectue d'une manière constante, et persiste tant que dure la période d'état. Quand l'amélioration se produit et que les selles perdent le caractère mucoso-sanglant pour devenir bilieuses et fécaloïdes, la flore intestinale réapparaît, et le nombre des colibacilles diminue : la phagocytose s'atténue parallèlement. Habituellement ces modifications, qui marquent le début de la guérison, se produisent d'une façon lente et graduelle : quelquefois cependant, elles peuvent s'effectuer brusquement du jour au lendemain, avec une intensité vraiment remarquable.

Dans les cas graves, où les selles sanglantes, noirâtres, contiennent des débris de muqueuse sphacélée, où le malade présente du collapsus, la flore intestinale ne réapparaît pas : au colibacille, jusque-là unique dans les selles, s'ajoutent les agents d'une infection secondaire : staphylocoque, streptocoque,

quelquefois le tétragène. Les divers microbes sont le plus souvent libres : la phagocytose est à peine marquée ou complètement nulle.

Il semble donc bien qu'il y ait une relation entre la phagocytose intestinale et l'évolution de la maladie : celle-ci est bénigne quand la phagocytose est intense, grave quand elle ne s'exerce pas.

La phagocytose, ici comme ailleurs, apparaît donc comme le moyen de défense de l'organisme contre l'agent pathogène qui évolue dans l'intestin.

Les injections sous-cutanées de sérum artificiel constituent un moyen d'activer cette phagocytose quand elle existe, ou de la provoquer quand elle est défaillante : en général, 3/4 d'heure ou 1 heure après l'injection, le malade est pris d'un frisson violent, suivi d'une élévation de température montant à 39°,5 ou 40° le plus souvent; une fois, le thermomètre a marqué 40°,5. La durée de la fièvre est variable suivant chaque individu; chez les uns elle peut durer 5 à 6 heures, après quoi la température revient à la normale; chez les autres, elle n'est que passagère et se termine au bout d'une heure ou deux ; chez d'autres enfin, elle ne se produit pas. L'intensité et la durée de l'élévation de température semblent donner le degré de la réaction défensive de l'organisme.

L'examen des selles pratiqué chez les sujets soumis aux injections de sérum a montré ce qui suit :

Avant l'injection, pendant l'algidité, les selles sanglantes montrent, comme il a été dit, du bactérium coli en grande quantité, associé au streptocoque, ou staphylocoque, ou aux deux en même temps, et pas de phagocytose. Les bactéries sont libres dans le liquide évacué.

Pendant la durée de la fièvre, le tableau est le même. Mais, au déclin de ce stade fébrile, ou bien lorsque la température est revenue à la normale, la phagocytose se montre très accusée ; elle s'opère sur les colibacilles, dont les leucocytes sont littéralement bourrés, ainsi que sur les agents qui leur sont associés. Les leucocytes ont une telle activité, qu'ils vont jusqu'à englober des globules rouges.

Le même malade peut, deux à trois jours après, présenter à nouveau le même collapsus, une nouvelle injection de sérum est pratiquée : la phagocytose reparaît.

La guérison définitive peut ainsi survenir sous cette influence stimulante. Le malade peut aussi décliner malgré ce traitement et réagir de moins en moins; l'injection n'est plus alors suivie de période fébrile, et la phagocytose cesse de se produire. Enfin, il est aussi des cas où l'organisme reste totalement indifférent à l'action du sérum : les injections ne produisent aucune réaction et n'excitent pas la phagocytose.

Dans la dysenterie, comme dans les maladies infectieuses, la phagocytose est donc le témoignage et le moyen de la défense de l'organisme. L'examen des selles peut donc avoir son importance pronostique.

REVUES ET ANALYSES

Rapport général sur les enquêtes concernant les eaux de source distribuées à Paris.

Le problème d'alimenter une grande ville en eaux de source est toujours difficile et parfois même impossible à résoudre. Il faut trouver, à une distance qui ne soit pas trop grande, de vastes surfaces, assez faiblement peuplées pour qu'on n'ait pas à y craindre la contamination du sous-sol, et que les eaux de pluie puissent en traverser les couches sans leur emprunter des germes dangereux ou de la matière organique.

Les eaux de pluies arrivent en effet à peu près pures à la surface du sol; là, elles trouvent en abondance des germes vivants et de la matière organique soluble, animale ou végétale, qu'elles entraînent en partie. A mesure qu'elles s'enfoncent, elles rencontrent des couches de plus en plus pures au contact desquelles elles se débarrassent, comme sur un filtre, de ce qu'elles ont pris à la surface, et il arrive parfois que, lorsqu'elles ressortent sous forme de sources, elles sont aussi pures de germes que si elles sortaient d'un filtre à filtrations fines, tel que le filtre Chamberland ou les filtres similaires.

Mais il faut pour cela que les fissures au travers desquelles elles ont circulé dans le sol soient très étroites, et des fissures étroites ont fatalement un faible débit et n'alimentent que des sources de peu

1. Ce Rapport est destiné à servir de préface à l'exposé des résultats d'une enquête faite par la Préfecture de la Seine pour étudier le périmètre d'alimentation des sources captées par la ville de Paris, et les conditions de filtration des eaux de pluie sur la surface limitée par ce périmètre. Les premières recherches ont montré que cette surface est beaucoup plus étendue qu'on ne le croyait, qu'elle embrasse des centaines de kilomètres carrés, et, en plus, que la filtration s'y fait en général dans des conditions très médiocres.

Comme ce cas n'est certainement pas particulier aux vallées étudiées, qu'il est au contraire le cas général, il a paru utile de publier ce Rapport qui donne une orientation nouvelle à la défense contre les maladies convoyées par l'eau potable, et spécialement contre la fièvre typhoïde. Ce Rapport a été accepté par la commission le 23 novembre 1900, et le service médical qu'il prévoit aura commencé à fonctionner à l'heure où paraîtront ces lignes.

E. D.

d'importance. Quand on veut capter des sources abondantes, valant les frais d'adduction, il faut renoncer à la filtration fine, accepter de grosses veines d'eau circulant, au moins sur un certain parcours, dans des fissures larges, dans lesquelles la filtration ne se fait plus, et se résoudre à retrouver dans les sources quelques-uns des germes rencontrés à la surface ou dans les profondeurs.

Il y a là un fait général et une loi inéluctable, contre laquelle l'homme, les parlements et les capitaux ne peuvent rien. On peut ajouter encore ceci : toute eau dissout les surfaces qu'elle lèche, élargit par conséquent les fissures qu'elle traverse, et tout filtre, naturel ou artificiel, perd de ses qualités par l'usage. Cette usure est surtout sensible dans les terrains calcaires, que depuis l'origine du monde les eaux sont constamment occupées à dissoudre et à entraîner. Les milliers de mètres cubes de matériaux dissous qu'amènent à Paris les sources de l'Avre, de la Dhuys et de la Vanne laissent à leur place des creux qu'un éboulement vient combler lorsqu'ils se sont trop agrandis, de sorte que le régime d'homogénéité du sol, qui a pu exister à l'origine, fait de plus en plus place au régime d'hétérogénéité des matériaux de démolition. Comme le monde est vieux, et comme les sources de l'Avre, de la Dhuys, de la Vanne, du Loing, du Lunain, coulaient depuis longtemps avant d'être amenées à Paris, c'est en présence de ces eaux, plus ou moins filtrées au travers d'éboulis, que se sont trouvés les ingénieurs quand ils ont voulu les capter pour les conduire dans la capitale.

Ces eaux présentaient à ce moment toutes les conditions requises par la science officielle d'alors; elles étaient fraîches, limpides, de saveur agréable et très pauvres en matières organiques. Fraîches, cela veut dire qu'elles avaient séjourné longtemps dans le sol ; limpides, qu'elles avaient subi une filtration assez parfaite. Peut-être le service des eaux eût-il pu, à un certain moment, prêter une oreille plus attentive aux nouvelles exigences que la science apportait dans la question, en montrant qu'une eau pouvait être sapide, fraîche et limpide, et contenir pourtant des germes dangereux pour qui la boit. Peut-être a-t-il eu tort de persévérer longtemps dans cette insouciance. Mais puisqu'il est revenu à une plus juste appréciation de ce que doit être une eau potable, il n'est que juste de reconnaître à sa décharge ceci, c'est que son œuvre, bonne et même très bonne, en ce qui concerne les principes qui l'ont inspiré et dirigé, s'est trouvée acceptable en ce qui concerne les préoccupations bactériennes ; elle n'est pas à refaire, elle est à corriger et à amender.

Les principes dont doit s'inspirer ce perfectionnement découlent des lois générales que nous avons rappelées en débutant, et qu'on

peut résumer en disant qu'il est vain d'espérer une eau de boisson privée de germes. Ceci n'est pas vrai seulement pour les eaux de sources : c'est vrai pour toutes les eaux purifiées par un moyen quelconque, filtration, chaleur, agents chimiques, etc. Quand on a obtenu par un de ces moyens une eau pure de microbes, il faut, pour la conserver en cet état, des précautions multipliées, impossibles à prendre en grand, et on ne sera vraiment assuré d'absorber de l'eau à peu près pure de microbes, que lorsqu'on se sera habitué à l'avaler bouillante ; encore n'est-il pas sûr que beaucoup de microbes n'auront pas pris à ce moment-là la même habitude. Mais tant que nous aimerons à boire frais, il faudra consentir à avaler des microbes.

C'est ici qu'apparaît une nouvelle loi naturelle dont la méconnaissance ou l'oubli ont conduit à toutes les exagérations. Le monde est vieux, dirai-je encore, et si tous les microbes étaient dangereux, comme nos aïeux en ont consommé depuis des siècles, nous serions bien malades ou bien clairsemés. Or l'expérience montre que le monde se peuple de plus en plus et que, dans la vie de la grande majorité des hommes, c'est la santé qui est la règle, et la maladie l'exception.

La science confirme cette donnée générale en nous montrant que nous hébergeons tous par milliards, dans notre canal intestinal, des microbes, en tout pareils à ceux que peuvent nous apporter les eaux, dont les uns sont absolument inoffensifs, dont les autres pourraient être dangereux s'ils avaient pénétré par une autre voie que la voie digestive, mais qui, là, restent inertes. L'intestin ne redoute vraiment que ceux qui peuvent produire des maladies intestinales, et parmi ceux-ci, c'est le bacille de la fièvre typhoïde qui est le plus répandu et le plus redoutable.

En forçant un peu la note, on pourrait donc dire que le chiffre de la population microbienne des eaux potables serait sans importance, si on était sûr qu'elle ne contient aucun bacille typhique, et, si celui-ci avait une forme ou portait un costume qui le rende facilement reconnaissable, le microscope suffirait à faire l'analyse hygiénique d'une eau.

Malheureusement il n'en est pas ainsi, et le bacille typhique est d'ordinaire très difficile à distinguer d'autres bacilles peu dangereux ou même inoffensifs qui habitent constamment l'intestin et qui forment le groupe du *bacillus-coli* ou coli-bacille.

Toutes les tentatives faites dans ce sens se sont montrées vaines et illusoires. Toutes les méthodes qui ont rencontré créance aboutissent les unes après les autres au doute, et jusqu'ici, le problème semble pratiquement insoluble par cette voie.

Il y en a heureusement une autre. Au lieu de surveiller le bacille typhique à son arrivée dans l'eau des sources ou au moment de son

passage à l'octroi de Paris, on peut essayer de le saisir à son point de départ, là où sa nature n'est pas douteuse, au moment où il sort de l'intestin d'un typhique. Si on réussit à l'arrêter en ce point, on sera dispensé de le suivre dans son voyage.

En se plaçant dans cet ordre d'idées, la première chose à faire est évidemment de déterminer les surfaces sur lesquelles l'apparition d'un typhoïque pourrait permettre aux bacilles sortis de son intestin d'arriver dans une des sources; en d'autres termes, ce qu'il faut faire tout d'abord, c'est déterminer le périmètre d'alimentation des sources captées par la Ville de Paris.

Les recherches que la Commission a dirigées dans ce sens, et qui ont été faites tant par l'Observatoire municipal de Montsouris que par un service créé dans la vallée de l'Avre, ont conduit, de prime abord, à des constatations qui pourraient sembler inquiétantes, si on les prenait en bloc et sans réflexion. C'est que le périmètre d'alimentation des sources circonscrit, dans chacun des bassins de l'Avre, de la Dhuys ou de la Vanne, une surface de plusieurs centaines de kilomètres carrés, et qu'il n'est guère de points sur cette immense surface sur lesquels des germes dangereux, déposés sur le sol par une voie quelconque, ne puissent arriver aux sources. Le sol est en effet partout, ainsi qu'on pouvait s'y attendre, un sol plus ou moins fissuré ou remanié. Dans l'ensemble, la filtration se fait mal, et les microbes ne sont que partiellement arrêtés en cours de route.

Une étude de détail montrera sûrement que la valeur filtrante du sol n'est pas partout aussi mauvaise. Il y a sûrement des couches où la filtration est fine et efficace. Mais on peut assurer aussi que si ce sont les meilleures pour la qualité de l'eau fournie, ce ne sont pas les meilleures au point de vue de la quantité, car l'eau préfère naturellement celles où elle passe plus vite et où sa filtration est incomplète. Ce sont ces zones de facile pénétration qu'il faut déterminer tout d'abord, parce que là le danger est plus grand et plus immédiat, mais sans négliger la surveillance sur la surface totale.

Cette surveillance, pour être efficace, serait un gros problème si on devait l'étendre à toutes les maladies contagieuses. Heureusement la question se limite, comme nous l'avons dit plus haut, à la fièvre typhoïde qui est à peu près la seule, parmi les maladies régnantes de notre pays, où les germes prennent naturellement le chemin du sol, et puissent être emportés par les pluies ou les eaux courantes en assez grande quantité pour arriver aux points d'émergence des sources.

Il y a évidemment beaucoup de maladies contagieuses autres que la fièvre typhoïde, et bien d'autres germes dangereux que ceux des selles. Tout malade en répand autour de lui dans l'air de sa chambre,

en souille ses linges, en apporte avec lui en mourant dans le sol du cimetière. Mais la contamination par l'air est négligeable à courte distance du malade. Les linges entraînent une surveillance du lavoir, le cadavre, celle du cimetière et des eaux qui le traversent. Ces réserves faites, il n'en reste pas moins que le gros péril, celui qu'ont avec raison visé les préoccupations publiques, c'est la fièvre typhoïde.

A ce point de vue, l'évidence des démonstrations est devenue telle que nous pouvons sans aucun dommage renoncer à tous les balbutiements auxquels la science s'astreint légitimement jusqu'au moment où sa conviction est assise. Il faut rayer délibérément aujourd'hui de nos discussions tous ces mots de coli-bacilles, de paracoli-bacilles, de bacilles d'Eberth, de bacilles éberthiformes, etc., qui flottent encore dans l'imagination publique. Tous ces mots n'auraient pas dû sortir des laboratoires, où ils formaient une langue un peu conventionnelle : la langue du doute et de l'hésitation. Ils n'en seraient pas sortis, pas plus que n'en sortent ceux qui naissent et meurent constamment à propos des autres sujets qui s'y agitent, si la question qu'ils visaient à élucider avait pu rester une question de laboratoire jusqu'à son plein épanouissement. Mieux renseignés, nous pouvons dire aujourd'hui : un typhoïque laisse échapper des germes dangereux : au moment où ils sortent de l'intestin du malade, il n'y a pas d'illusion à se faire sur eux, ils sont bien définis, ce sont des bacilles typhiques. Nous sommes assurés, d'un autre côté, qu'une fois déposés sur le sol de la région qui alimente nos sources, ils peuvent arriver à Paris, et que, s'ils rencontrent des obstacles en route, ces obstacles ne les arrêtent pas tous. Si donc nous voulons nous en débarrasser, n'attendons pas qu'ils aient accompli ce voyage souterrain, pendant lequel ils se maquillent et prennent une physionomie d'honnêtes bacilles qui les rend impossibles à reconnaître. Tâchons de les arrêter au point de départ, et nous serons débarrassés des soucis, des confusions et des lenteurs inévitables de la surveillance au point d'arrivée.

Ce qui augmente l'intérêt et la valeur de cette conclusion, c'est que cette surveillance des typhoïques, dans tout le périmètre d'alimentation des sources, est relativement facile. Le nombre des cas est toujours restreint. Il y a, répartis sur cette surface, une vingtaine de médecins, non compris les médecins des épidémies, dont il faudrait s'assurer le concours. La fièvre typhoïde n'est pas une de ces maladies que les familles tiennent à garder secrètes, et si sa divulgation est profitable, si elle a pour corollaire des soins gratuits, une désinfection sans frais, au besoin le concours d'une garde-malade expérimentée, elle ne soulèvera aucune objection : on pourra sur d'autres points faire valoir des considérations plus élevées, celles qui commandent de ne pas s'exposer sciemment à faire du mal à son prochain. D'une manière générale, on

peut dire qu'il n'est pas impossible à l'Administration d'être avertie des cas de fièvre typhoïde qui peuvent éclater dans la région d'alimentation de la Vanne, de l'Avre, de la Dhuys, du Loing, du Lunain et d'obtenir du médecin traitant un concours qui ne nuit à personne et tourne au bien de tous, y compris le malade et son entourage.

S'il survenait une épidémie de fièvre typhoïde dans la région, on appliquerait avec un plus nombreux personnel la même tactique, et on serait alors aidé dans cette voie par l'opinion publique, aussi indifférente vis-à-vis des cas isolés et sporadiques que prompte à s'émouvoir quand ils deviennent plus nombreux. Ce serait alors le cas d'engager les Parisiens à faire bouillir leur eau avant de la boire, et personne ne pourrait s'étonner alors qu'à des cas exceptionnels correspondent des mesures exceptionnelles. Toutes les installations des particuliers et des villes sont faites pour des temps de calme et de paix. On ne bâtit pas les maisons dans les villes frontières en vue de leur permettre de résister à un siège, et on ne fait pas davantage une canalisation d'eau en vue de tous les accidents qui peuvent survenir.

Voilà pour le passé et pour le meilleur emploi de ce qui existe. Il est pourtant nécessaire de tirer de tout ce qui précède une conclusion. C'est que désormais l'étude du périmètre d'alimentation des sources, des parcours souterrains des ruisseaux qui les alimentent, des contaminations auxquelles elles sont exposées sur ce parcours, devront précéder, au lieu de les suivre, tous les travaux d'adduction. On croyait jusqu'ici, d'une manière relative, sinon absolue, à la puissance filtrante du sol. S'il y a des régions où cette puissance est efficace, il en est d'autres où elle est faible ou nulle, et où les cimetières, les lavoirs, les fosses d'aisances sont une menace permanente pour la circulation souterraine et les eaux de sources. Ce sont ces régions plus particulièrement menacées qu'il faudra éliminer tout d'abord ; quant aux autres, où la menace est moins pressante, il faudra, après leur avoir emprunté leurs eaux, les soumettre à la surveillance médicale permanente qui devient aujourd'hui, et jusqu'à de nouvelles découvertes de la science, la pièce maîtresse de la résistance à opposer à la pollution des eaux.

Ces mesures de protection médicale n'empêcheront pas de poursuivre les recherches de laboratoire, l'amélioration des points faibles de la canalisation, la revision des ouvrages de captage des sources et les travaux à entreprendre pour éviter l'arrivée directe et sans filtration, à la nappe souterraine, de grosses masses d'eau suspecte.

En se superposant à une situation qui, sans être parfaite, est acceptable, ainsi que l'a montré l'expérience de plusieurs années, elle l'améliorera sûrement. Il serait vain d'espérer que la fièvre typhoïde disparaîtra, car elle ne provient pas uniquement de l'eau potable. Mais quand on aura aveuglé cette voie principale, il sera plus

facile de découvrir les autres fissures par lesquelles elle peut se glisser.

En tout cas, la défense a changé d'orientation et se fait dans une direction où elle est plus facile, plus efficace et plus économique. La Commission peut, je crois, présenter en toute confiance cette orientation nouvelle comme résumé de ses études et de ses travaux.

E. DUCLAUX

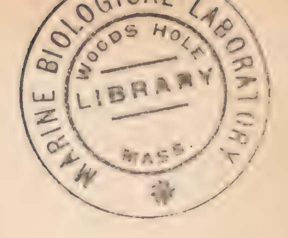


TABLE DES MATIÈRES

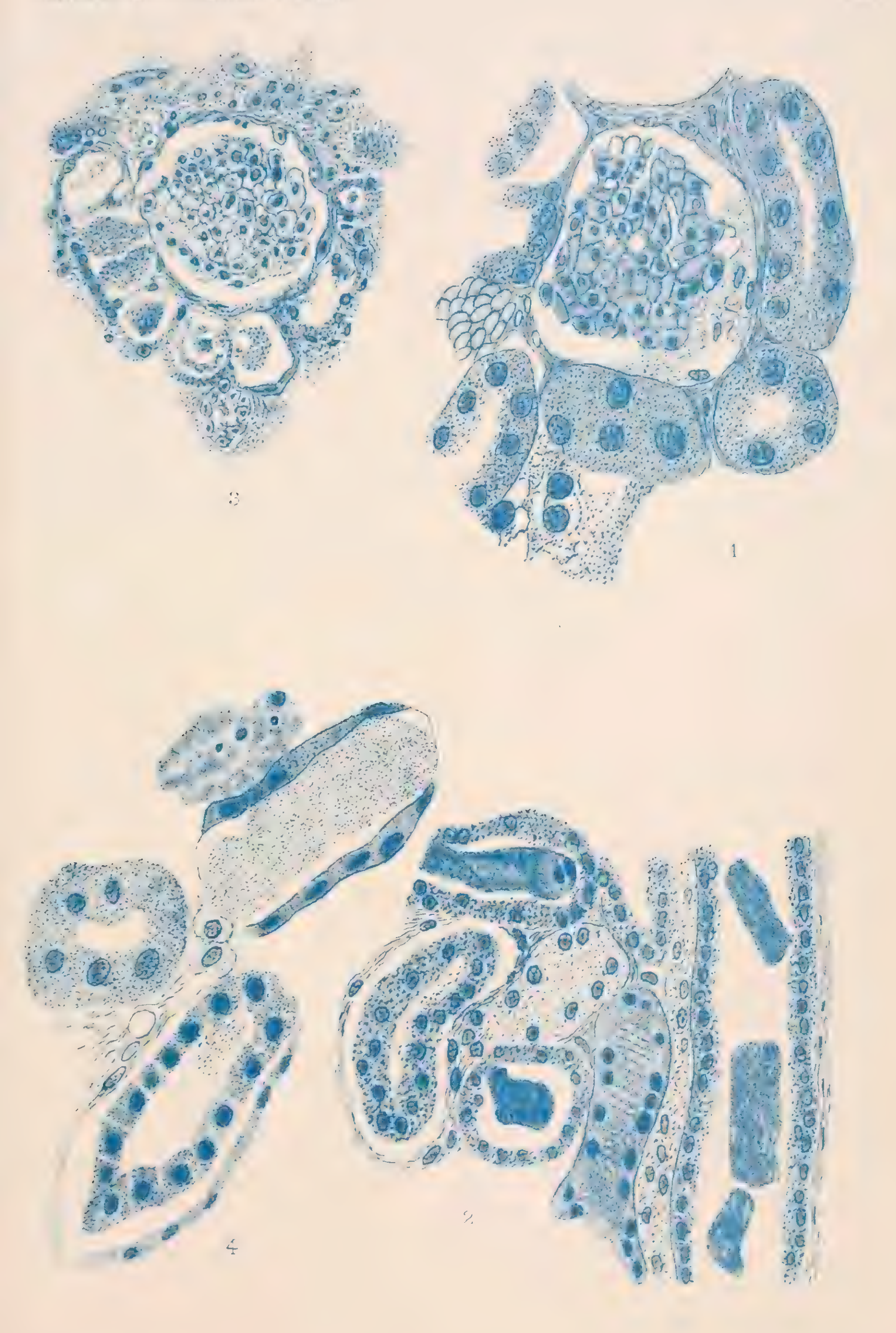
TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

TRAVAUX ORIGINAUX

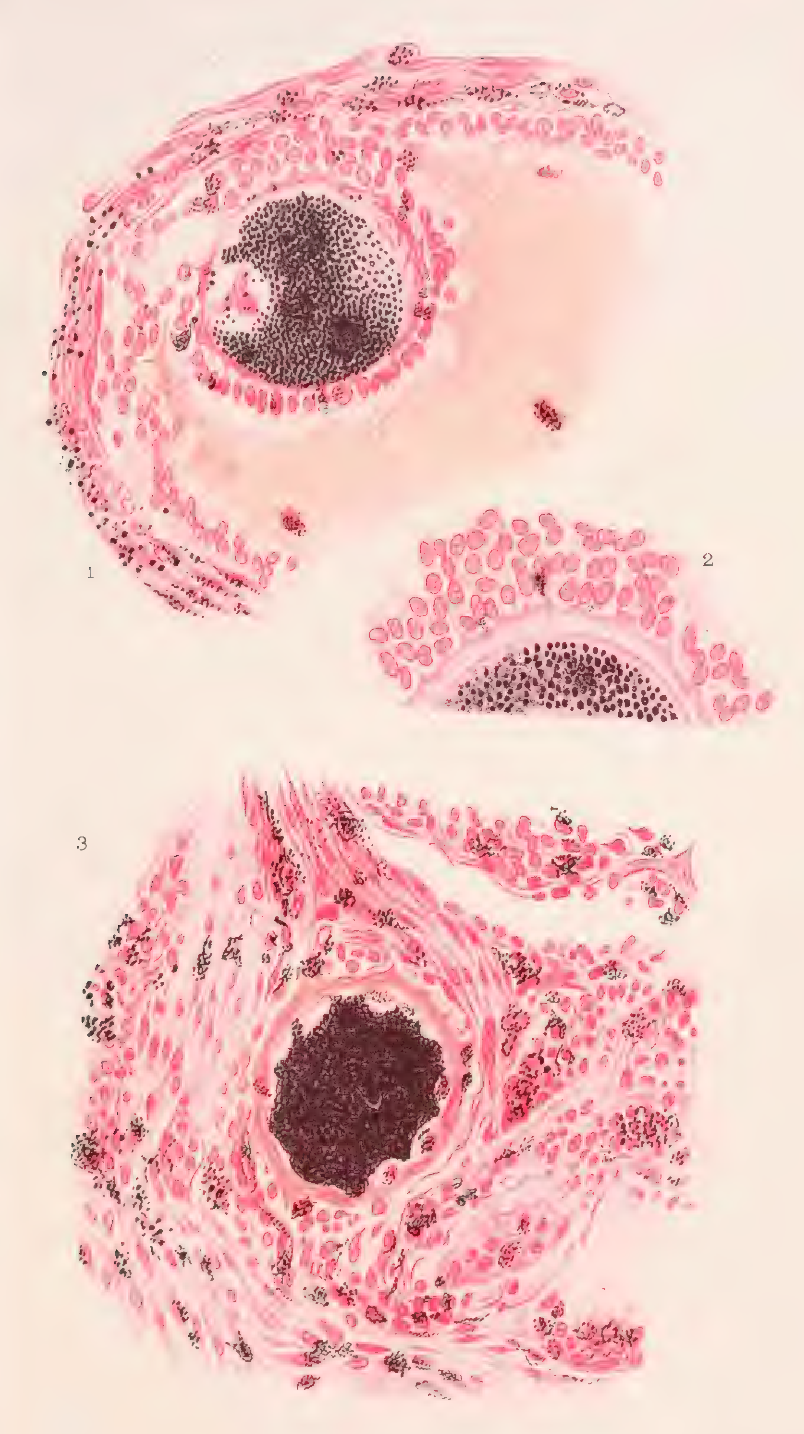
REVUES CRITIQUES

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

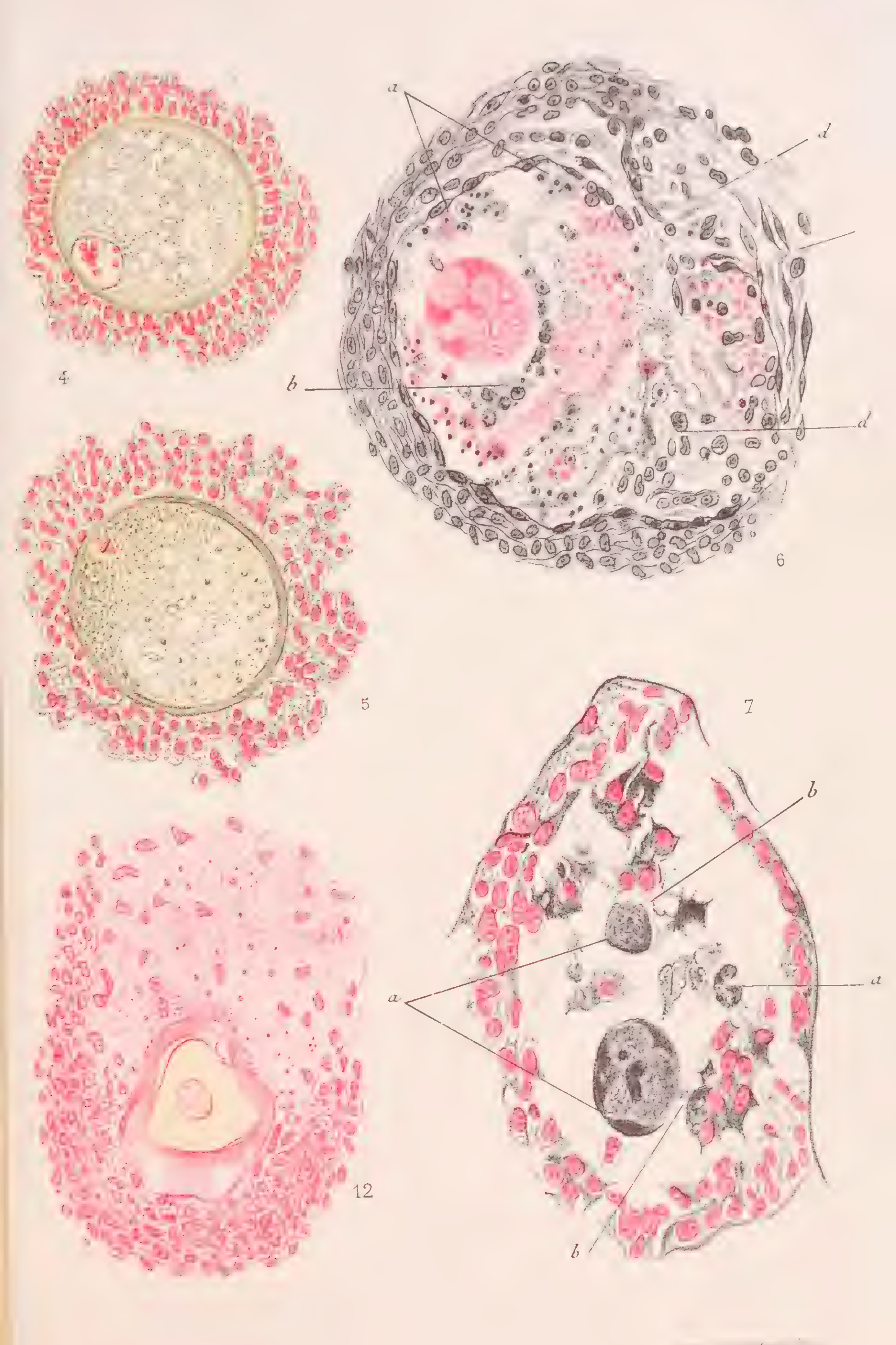
Le Gérant : G. Masson.



V. Roussel lith.



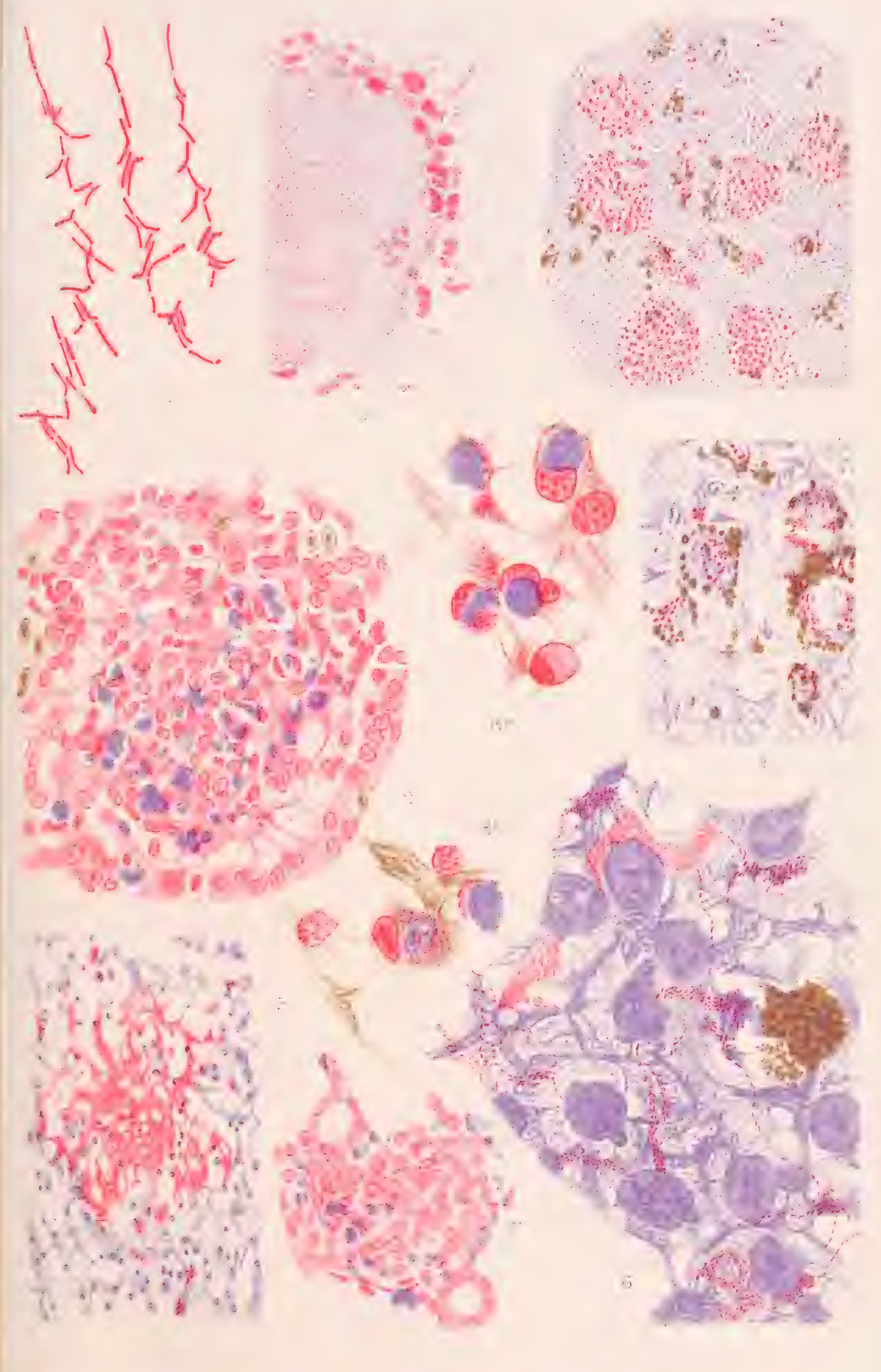
J. Roussel del. & lith. Imp. Lafontaine, Paris



V. Roussel, del. & lith.

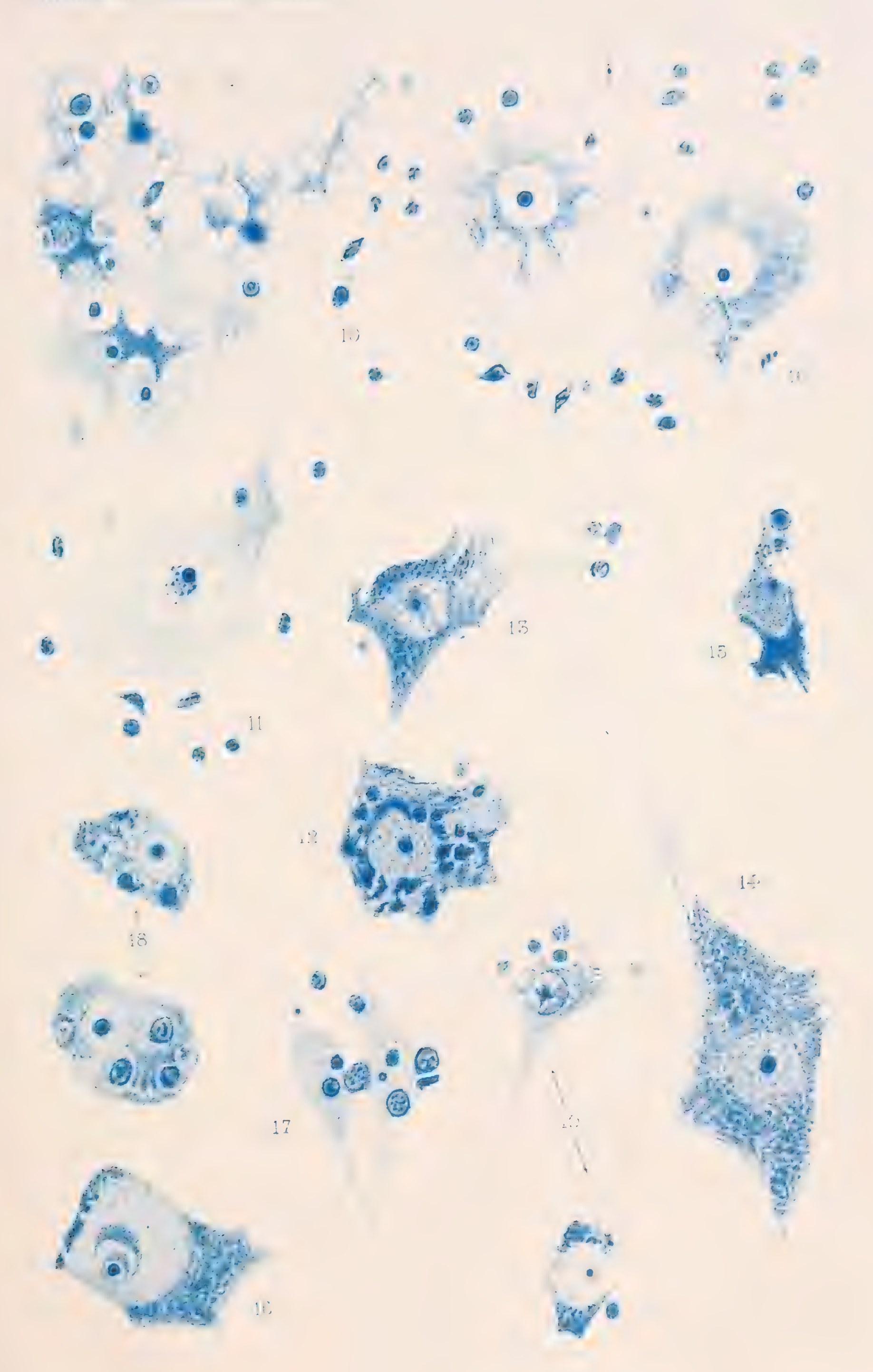


V. Roussel, del. & lith.



A. Karmanski & V. Roussel, del.


1a
1b
2
3
4
6
7
7
7
9

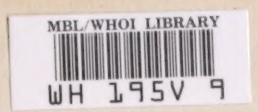


V. Roussel, del & lith.

Imp. L. Lafontaine, Paris.


MARINE BIOLOGICAL
LIBRARY
MASS.




MBL/WHOI LIBRARY
WH 195V 9

